

メチル水銀による脳特異的なケモカイン発現誘導とその機構解析

著者	金 ??
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16036号
URL	http://hdl.handle.net/10097/61341

メチル水銀による脳特異的なケモカイン発現誘導と
その機構解析

東北大学大学院薬学研究科
生命薬学専攻

金 旻錫

略語表

本論文では以下の略語を使用した。

bp : base pair

BSA : bovine serum albumin

cDNA : complementary DNA

D'MEM : Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

DNA : deoxyribonucleic acid

DTT : dithiothreitol

EDTA : ethylenediamine-*N*, *N*, *N'*, *N'*-tetraacetic acid

EMSA : electrophoretic mobility shift assay

GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

HEPES : 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid

PBS(-) : phosphate buffered saline, Ca^{2+} and Mg^{2+} free

PCR : polymerase chain reaction

MeHgCl : methylmercuric chloride

mRNA : messenger RNA

NP-40 : nonidet 40

RIPA : radioimmunoprecipitation assay buffer

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

siRNA : small interfering ribonucleic acid

TBS : tris-buffered saline

目次

第一章 緒言-----	1
第二章 メチル水銀を投与したマウス小脳における遺伝子発現変動	
第一節 目的-----	3
第二節 実験材料および実験方法-----	4
第三節 実験結果-----	8
1. メチル水銀によって小脳中で発現誘導された遺伝子	
第四節 考察-----	10
第三章 メチル水銀によって脳特異的に発現誘導されるケモカイン分子種の 検索	
第一節 目的-----	11
第二節 実験材料および実験方法-----	12
第三節 実験結果-----	14
1. メチル水銀がマウス各組織における全ケモカイン分子種の発現レベルに与 える影響	
2. メチル水銀によって脳組織特異的に発現誘導されるケモカイン分子種の 検索	
第四節 考察-----	21
第四章 メチル水銀毒性とケモカイン発現誘導との関係	
第一節 目的-----	22
第二節 実験材料および実験方法-----	23
第三節 実験結果-----	31
1. C17.2 細胞においてメチル水銀がケモカインの発現レベルに与える影響お	

よびメチル水銀毒性との関係	
2. マウスのメチル水銀投与による脳の病理変化とケモカイン発現誘導との関係	
3. ケモカインの培地中への添加がマウス小脳初代培養神経細胞のメチル水銀感受性に与える影響	
4. C17.2 細胞における CCL3 および CCL4 の発現抑制がメチル水銀感受性に与える影響	
第四節 考察	39
第五章 メチル水銀によるケモカイン発現誘導機構の解析	
第一節 目的	40
第二節 実験材料および実験方法	41
第三節 実験結果	50
1. メチル水銀による CCL4 発現誘導に関わるプロモーター領域の特定	
2. メチル水銀による CCL4 の発現誘導に関わる転写因子の検索	
3. メチル水銀が FOXA1 および SRF の細胞内レベルおよび細胞内分布に与える影響	
4. メチル水銀が CCL4 プロモーター上への FOXA1 および SRF の結合に与える影響	
5. FOXA1 および SRF の発現抑制がメチル水銀による種々のケモカインの発現誘導に与える影響	
6. メチル水銀が Rho シグナル経路依存的な SRF 活性化機構に与える影響	
7. メチル水銀が MAP キナーゼシグナル経路依存的な SRF 活性化機構に与える影響	
第五節 考察	65
第六章 まとめ	68

謝辭-----	71
---------	----

引用文献-----	72
-----------	----

第一章 緒言

メチル水銀は水俣病の原因物質として知られる有機水銀化合物である。水俣病はアセトアルデヒド製造過程において触媒として用いられた無機水銀から部分的に生成したメチル水銀が海に排出され、それが原因となって周辺住民が発症した公害病である (Harada, 1995)。

水銀は環境中ではほとんどが無機水銀の形で存在するが、その一部が微生物などによってメチル化される。海中のメチル水銀は食物連鎖によって生物濃縮されるため、高次捕食者である大型魚類（マグロ、キハダ、カジキなど）中には高濃度のメチル水銀が蓄積している。メチル水銀は、無機水銀に比べて消化管からの吸収率が非常に高く、吸収後は肝臓や腎臓など様々な臓器に移行するが、その一部は血液脳関門も通過して脳中に蓄積する。メチル水銀は脳神経細胞に障害を与え、言語障害、感覚麻痺、運動失調、視野狭窄などを特徴とするハンター・ラッセル症候群を引き起こす (Aschner *et al.*, 1990; Vahter *et al.*, 2000)。また、メチル水銀は血液胎盤関門も比較的容易に通過し、発達が未熟な胎児の脳に影響を与える (Ballatori, 2002; Castoldi *et al.*, 2008)。水俣病発症当時の水俣においては、妊娠中の母親にはほとんど症状がでなかったにもかかわらず、出生児がメチル水銀中毒（胎児性水俣病）を発症しているという例が報告されている (Sanfeliu *et al.*, 2003)。近年においても、疫学調査によって、妊婦の魚類を介したメチル水銀の過剰摂取が胎児の脳の発育に影響を与えることが報告され、日本、米国、カナダ、ノルウェーなどで妊婦に対して大型魚類の摂取を制限するようにとの勧告がだされるなど、世界的な社会問題となっている (Grandjean *et al.*, 1992, 1997)。

しかし、水俣病が発症して半世紀以上経った現在でも、メチル水銀による中

中枢神経毒性発現機構は未だほとんど解明されていない。本研究では、メチル水銀が示す中枢神経系に選択的な毒性の発現機構を解明するための手掛りを得るために、マウス脳組織でメチル水銀投与によって発現レベルが変動する遺伝子を検索した。

第二章 メチル水銀を投与したマウス小脳における遺伝子発現変動

第一節 目的

メチル水銀は中枢神経系に選択的な障害を与えるが、その機構は未解明である（Aschner *et al.*, 1990; Vahter *et al.*, 2000）。そこで、メチル水銀が示す中枢神経系に選択的な毒性の発現機構を解明するため、メチル水銀を投与したマウス小脳中の遺伝子発現レベルの変動を DNA マイクロアレイ法によって解析した。

第二節 実験材料および実験方法

1. 実験材料

- 生物材料

C57BL/6NCr、雄マウス

- 器具材料

1.5 mL、0.5 mL tube : Tokyo Wstson

- 機器材料

イオン交換水、超純水 : Millpore

定量 PCR 装置 : Thermal Cycler Dice (Takara)

分光光度計 : ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop)

- 試薬

Methylmercuric chloride : Wako

Nuclease free water : Qiagen

Ethanol : Nacalai

2-propanol : Nacalai

- キット

PrimeScript RT reagent Kit : Takara

SYBR Prime Ex Taq (Perfect Real Time) : Takara

2. 実験方法

2-1. マウスへのメチル水銀の投与

体重 20~22 g の 7 週齢の C57BL/6NCr 雄マウスに 10 mg/kg bw となるように塩化メチル水銀溶液を毎日一回、7 日間皮下注射し、最終投与 24 時間後、マウスの小脳を摘出した (Hwang *et al.*, 2013)。

2-2. DNA microarray

2-1 で摘出したマウス小脳をサンプルとして、Agilent 社に依頼し Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis System によって遺伝子発現レベルを解析した。

2-3. Total RNA の抽出

摘出した小脳に 500 μ L の ISOGEN II を加えてホモジナイゼーションした。そこに、 H_2O 200 μ L を加え、ボルテックスした後、10 分間 incubation し、8,000 \times g, 15 分間遠心した。その後、上清 500 μ L を新しい 1.5 mL tube に回収し、エタノールを 300 μ L 加えて、混和し、12,000 \times g, 10 分間遠心した。上清を取り除いた後、沈殿物を 500 μ L の 75%エタノールで二回洗浄し、風乾した後、RNase free water を 20~50 μ L 加えた (Takahashi *et al.*, 2013)。

2-4. 逆転写反応 (PrimeScript RT reagent Kit)

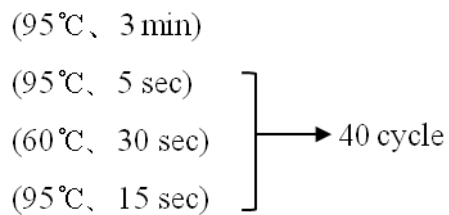
Total RNA 100 ng に対し、5 \times PrimeScript Buffer (for Real Time) 2 μ L、Random 6 mers 50 pmol、PrimeScript RT Enzyme Mix I 50 U、Oligo dT Primer 25 pmol となるように反応液を調製し、37 $^{\circ}C$ で 15 分間逆転写反応した後、85 $^{\circ}C$ で 5 秒間処理

し逆転写酵素を失活させた。

2-5. 定量 PCR

cDNA 1 μ L に対し、SYBR Prime Ex Taq 5 μ L、forward primer 0.2 μ L および reverse primer 0.2 μ L、超純水 3.6 μ L となるように反応液を調製し、定量 PCR は thermal Cycler Dice real time で real-time PCR を行った。mRNA レベルは内標準対照遺伝子として一般的に発現量が一定であると考えられている GAPDH を用いて標準化した。

< 定量 PCR 反応条件 >



【定量 PCR プライマー配列】

Gene	Sense (5' → 3')	Antisense (5' → 3')
CCL4	caaacctaaccccgagcaacac	ggtctcatagtaatccatcacaaagc
CCL2	ttgtcaccaagctcaagagaga	gaggtggttgaggaaaaggtag
Scgb3a1	tctgtgtggctctgctcagt	gatggccaagtggcttaatg
Serpina3n	tagggtgtggtcaggtcctc	acattgatgggtgctggtgaa
CCL7	aatgcatccacatgctgcta	ctttggagttggggtttca
Ch25h	caaagggcacaaagtctgtga	gcgaccaatacatgagctt
Lpl	ccatcctcagtcccagaaaa	gggctctgcctgagttgtag
Clec7a	tagtttgggatgccttgag	ggaatcctgtgctttgtgt
CCL12	gtcctcaggtattggetgga	gggtcagcacagatctcctt

Plin4	cccatggtagtggtctgt	accaccagagacaccagtc
Chi3l3	aatgattcctgctcctgtgg	actttgatggcctcaacctg
Timp1	ctcagagtacgccaggaac	attcaaggctgtgggaaatg
Cox6a2	attgtggaaaagcgtgtggt	gacctttgtgctggctcttc
CCL9	tgtttcacatgggctttcaa	ttgtaggtccgtgggtgtga
Ctla2a	gcccttcaggtgtcagata	agcttctacatgggcctgaa
Bcl2a1b	tccacgtgaaagtcaccaa	tccctggctgagcactatct
Ctla2b	gcccttcaggtgtcagata	agcttctacatgggcctgaa
Gfap	tcacatcaccacgtccttgt	agaaaaccgcacaccattc
Fcgr2b	cagcagccagtcagaaatca	ccctgggaactcttctaccc
Cd14	gcttcagcccagtgaaagac	ctgatctcagccctctgtcc
Ms4a6d	agggaacagatgccaaaatg	gaatcagctttcccaaaca
GAPDH	aactttggcattgtggaagg	acacattgggggtaggaaca

第三節 実験結果

1. メチル水銀によって小脳中で発現誘導された遺伝子

雄の C57BL/6 マウスに 10 mg/ kg/day のメチル水銀を 1 日 1 回ずつ 7 日間連続投与し、最終投与の 24 時間後に小脳を摘出し、遺伝子の発現変動を DNA マイクロアレイ法で解析した。その結果、メチル水銀によって発現レベルが上昇する遺伝子が少なくとも 21 種確認された (Table 1)。これら遺伝子の発現変動をリアルタイム PCR 法によって調べたところ、Clec7a および Plin4 以外の 19 種の遺伝子が、メチル水銀によって有意に発現上昇することが確認された (Table 1)。なお、Clec7a は小脳での発現が確認出来ず、Plin4 はメチル水銀によって発現レベルが上昇する傾向は認められたものの有意な差ではなかった (Table 1)。

Table 1. Genes whose level of expression were changed in the cerebellum of mice in response to administration of methylmercury.

Gene name	Changes in transcript levels		Function of gene product
	DNA microarrays	Quantitative real-time PCR	
[Increased]			
CCL4	17.30±6.43	70.39±22.63**	Inflammation
CCL2	11.30±2.59	22.31±11.73**	Inflammation
Scgb3a1	9.95±3.08	33.56±11.84***	Inflammation
Serpina3n	7.43±2.48	13.20±8.18*	Signal transduction
CCL7	6.66±3.02	10.13±5.89**	Inflammation
Ch25h	5.97±2.71	22.47±4.55***	Metabolism
Lpl	5.57±2.06	12.41±3.90***	Metabolism
Clec7a	5.43±2.43	ND	Metabolism
CCL12	4.95±2.99	31.05±19.41**	Inflammation
Plin4	4.57±1.20	1.82±0.83	Metabolism
Chi3l3	4.42±1.69	6.36±3.77*	Inflammation
Timpl	4.13±2.44	5.31±1.47***	Inflammation
Cox6a2	3.84±0.59	4.20±0.53***	Metabolism
CCL9	3.60±1.76	6.32±2.91**	Inflammation
Ctla2a	3.02±0.68	5.74±2.60**	Inflammation
Bcl2a1b	2.86±0.70	3.16±0.95**	Antiapoptosis
Ctla2b	2.69±0.52	6.83±4.46*	Inflammation
Gfap	2.64±0.48	4.81±2.11*	Cell structure
Fcgr2b	2.57±0.60	2.17±0.55**	Phagocytosis
Cd14	2.53±0.37	5.80±2.12**	Inflammation
Ms4a6d	2.46±0.16	10.32±4.10**	Unknown

C57BL/6 mice were subcutaneously injected with 10 mg/kg/day MeHgCl for 7 days, and gene expression in the cerebellum was analyzed using DNA microarrays. The gene presented in the table include those whose levels of expression increased more than two-fold. mRNA levels of these 21 genes were measured by quantitative real-time PCR and mRNA levels normalized to GAPDH levels. Data are presented as mean ± S.D. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$ compared with the control group. Data were analyzed using Student's t -test. ND: not detected.

第四節 考察

メチル水銀によってマウス小脳での発現上昇が見られた遺伝子の中には、5つのケモカイン (CCL2、CCL4、CCL7、CCL9 および CCL12) (Yoshimura *et al.*, 1989; Wolpe *et al.*, 1988; Godiska *et al.*, 1995; Lean *et al.*, 2002; Sarafi *et al.*, 1997)、セクレトグロビン Scgb3a1 (Mukherjee *et al.*, 2007)、細胞傷害性 T リンパ球抗原 (Ctla2a、Ctla2b) (Denizot *et al.*, 1989) など炎症反応に関与する蛋白質をコードしているものが多く存在した。したがって、これらの因子が関わる炎症反応がメチル水銀毒性発現機構に関与している可能性も否定できない。この中でもケモカインは複数の分子種が発現上昇を示したことから、メチル水銀曝露に対する細胞応答機構において重要な役割を果たしている可能性も考えられる。

今回メチル水銀による発現上昇が認められた遺伝子のほとんどは、これまでにメチル水銀毒性との関係が報告されたことのない遺伝子であった。本研究で得られた知見はメチル水銀曝露に対する細胞応答機構の解明に繋がる有用な情報になるものと考えられる。

第三章 メチル水銀によって脳特異的に発現誘導されるケモカイン分子種の検索

第一節 目的

第二章で述べたように、メチル水銀を投与したマウス小脳において、複数のケモカイン分子種の mRNA レベルが顕著に上昇することが判明した。ケモカインは、低分子量（約 8~14 kDa）の分泌蛋白質であり、サイトカインの一種である（Wells *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2007）。N 末端のシステイン残基の構造上の特徴から C ケモカイン、CC ケモカイン、CXC ケモカインおよび CX3C ケモカインに分類され、これまでにヒトのケモカインが 50 種類以上、マウスのケモカインは 37 種類が同定されている（Rollins *et al.*, 1997）。ケモカインは感染、アレルゲンなどの炎症性刺激により活性化された免疫系細胞から分泌され、炎症組織内への白血球の遊走をもたらすことによって炎症を促進することが知られているが（Luster, 1998）、脳内での役割についてはほとんど明らかにされていない。また、メチル水銀曝露とケモカイン誘導との関連性について検討した報告もほとんどない。そこで本章では、メチル水銀によって脳組織特異的に発現誘導されるケモカイン分子種を検索した。

第二節 実験材料および実験方法

1. 実験材料

- 生物材料、器具材料、機器材料、試薬、キットは第二章と同じものを使用した。

2. 実験方法

2-1. マウスへのメチル水銀の投与

体重 20~22 g の 7 週齢の C57BL/6NCr 雄マウスに 10 mg/kg bw となるように塩化メチル水銀溶液を毎日一回、7 日間皮下注射し、最終投与 24 時間後、マウスの小脳を摘出した。各組織中の mRNA レベルの測定は第二章と同じ方法で行った。

【定量 PCR プライマー配列】

Gene	Sense (5' → 3')	Antisense (5' → 3')
CCL1	ggatgttgacagcaagagca	tagttgaggcgcagctttct
CCL2	ttgtcaccaagctcaagagaga	gaggtggttgaggaaaaggtag
CCL3	atgaaggtctccaccactgc	cccaggtctctttggagtca
CCL4	caaacctaacccecgagcaacac	ggtctcatagtaatccatcacaagc
CCL5	ccctcaccatcatcctcact	ccttcgagtgacaaacacga
CCL6	aggctggcctcatacaagaa	tcccctcctgctgataaaga
CCL7	aatgcatccacatgctgcta	ctttggagttgggggtttca
CCL8	ttctttgcctgctgctcata	tctggaaaaccacagcttcc
CCL9	tgtttcacatgggctttcaa	ttgtaggtccgtggttgta
CCL11	tccacagcgttctattcct	ctatggctttcagggtgcat
CCL12	gtcctcaggtattggctgga	gggtcagcacagatctcctt
CCL17	tgcttctggggactttctg	tggccttcttcacatgtttg
CCL19	agactgctgcctgtctgtga	gcctttgttcttggcagaag
CCL20	cgactgttgccctcgtaca	aggaggttcacagccctttt

CCL22	gctctcgtccttcttgcgtg	gcaggattttgaggtccaga
CCL24	ctgtgaccatccccctcatct	tatgtgcctctgaaccacaca
CCL25	ctgggttaccagcacaggat	ctcatcgccctcttcacatt
CCL26	ttgttctcctggccatcttc	tcactgggtgcagctcttgct
CCL27	tgtctccaacaagccagaga	gacagcctggaggtgacagt
CCL28	gttcatgcagcatccagaga	cctgtgtgtccacgtgttc
CXCL1	gctgggattcacctcaagaa	tggggacaccttttagcatc
CXCL2	agtgaactgcgctgtcaatg	ttcaggggtcaaggcaactt
CXCL3	agtgcctgaacaccctacca	ggacttgccgctcttcagta
CXCL4	agtcctgagctgctgcttct	ggcaaattttctcccattc
CXCL5	tggcccttcctcagtcatag	gtgcattccgcttagctttc
CXCL7	tgggcttcagactcagacct	tcctggcctgtacacattca
CXCL9	tttctcttgggcatcatc	agtccggatctaggcagggt
CXCL10	aagtgcctgccgtcattttct	gtggcaatgatctcaacacg
CXCL11	agctgctcaaggcttctta	ctgcattatgagcgagctt
CXCL12	gctctgcatcagtgacggta	taatttcgggtcaatgcaca
CXCL13	tctggaagcccattacacaa	tttgaaccatttggcacga
CXCL14	aagctggaaatgaagccaaa	cttctcgttccaggcattgt
CXCL15	ccatgggtgaaggctactgt	tagagggtctcccgaattgga
CXCL16	gggaagagttttcaccacca	ggttgggtgtgctctttgtt
CXCL17	tgttgcttccagtgatgctc	gctgtggcttttctcttgg
XCL1	tgactttcctgggagctctgc	catttggcttctggatcagc
CX3CL1	gcagatccccagaaactgag	ggcaccaggacgtatgagtt
GAPDH	atcaccatcttccaggagcga	agggggccatccacagtctt

2-2. 各組織中での水銀濃度の測定

上記の条件でのメチル水銀を投与したマウスの各組織中の水銀濃度を水銀測定装置（RA-915+ mercury analyzer、水銀の吸収波長；254 nm）を用いて測定した。

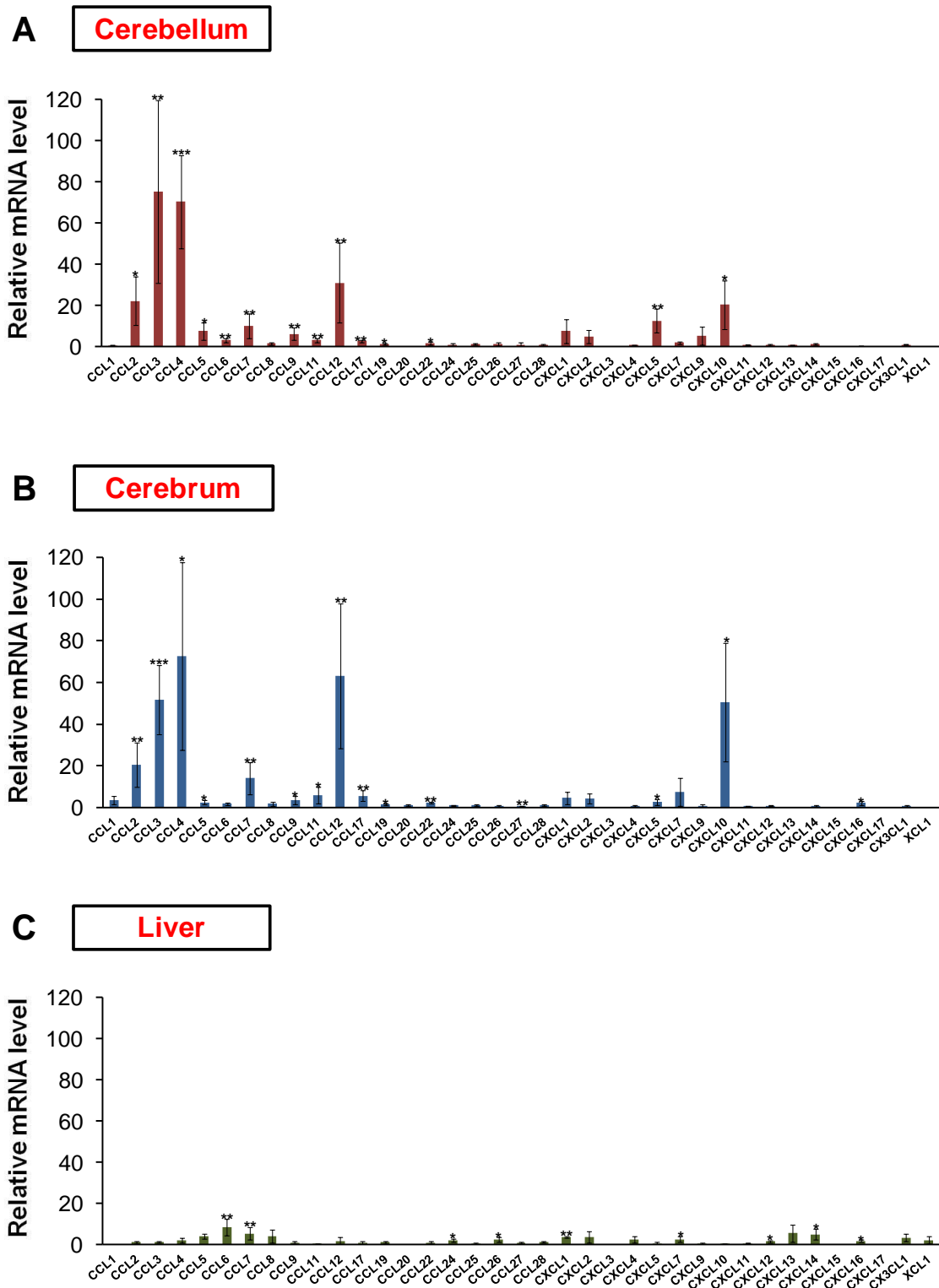
第三節 実験結果

1. メチル水銀がマウス各組織における全ケモカイン分子種の発現レベルに与える影響

第二章の DNA マイクロアレイ解析を行った際と同じ条件で、マウスにメチル水銀を投与した後に、小脳、大脳、肝臓、腎臓および脾臓を摘出し、各組織中の全ケモカイン分子種 37 種について、mRNA レベルをリアルタイム PCR 法によって解析した。なお、本実験条件では、3 日間のメチル水銀投与によってマウスの体重の有意な減少が認められ、7 日間の投与 24 時間後には約 18% の体重低下を示した（データ示さず）。

小脳中では、DNA マイクロアレイによって発現上昇が確認された 5 種（CCL2、CCL4、CCL7、CCL9 および CCL12）に加えて、8 種のケモカイン（CCL3、CCL5、CCL6、CCL11、CCL17、CXCL5、CXCL10 および CXCL16）が 2 倍以上の発現上昇を示した（Figure 1A）。大脳中では、13 種（CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL9、CCL11、CCL12、CCL17、CCL22、CXCL5、CXCL10 および CXCL16）のケモカインの発現上昇が認められた（Figure 1B）。なお、CCL2、CCL3、CCL4、CCL7、CCL12 および CXCL10 は小脳および大脳のどちらにおいても 10 倍以上の発現上昇した（Figure 1A、1B）。肝臓においては、7 種（CCL5、CCL6、CCL24、CCL26、CXCL1、CXCL7 および CXCL14）のケモカインが有意に発現上昇したが、脳組織に比べて、上昇の程度は低かった（Figure 1C）。腎臓においては、14 種（CCL2、CCL6、CCL7、CCL9、CCL12、CCL20、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL16、CXCL17、CX₃CL1）のケモカイン分子種がメチル水銀によってその発現が有意に上昇した（Figure 1D）。脾臓においては、CCL6 および CCL9 が、メチル水銀によって有意に上昇したが、その程度は 2 倍程度

と低いものであった (Figure 1E)。以上の結果、メチル水銀投与によって、どの組織においてもケモカインの発現誘導が認められたが、特に小脳、大脳、腎臓において、多くのケモカイン分子種の誘導が確認された (Table 2)。その中でも CCL3、CCL4、CXCL10 は脳組織で顕著に上昇したものの、他の組織では上昇が認められなかった。なお、メチル水銀を投与したマウスの各組織の水銀濃度を調べたところ、水銀は小脳および大脳よりも、肝臓や腎臓中に多く蓄積していた (Figure 2)。以上の結果からこれら CCL3、CCL4 および CXCL10 はメチル水銀によって脳特異的に発現誘導されるケモカインであると考えられる。



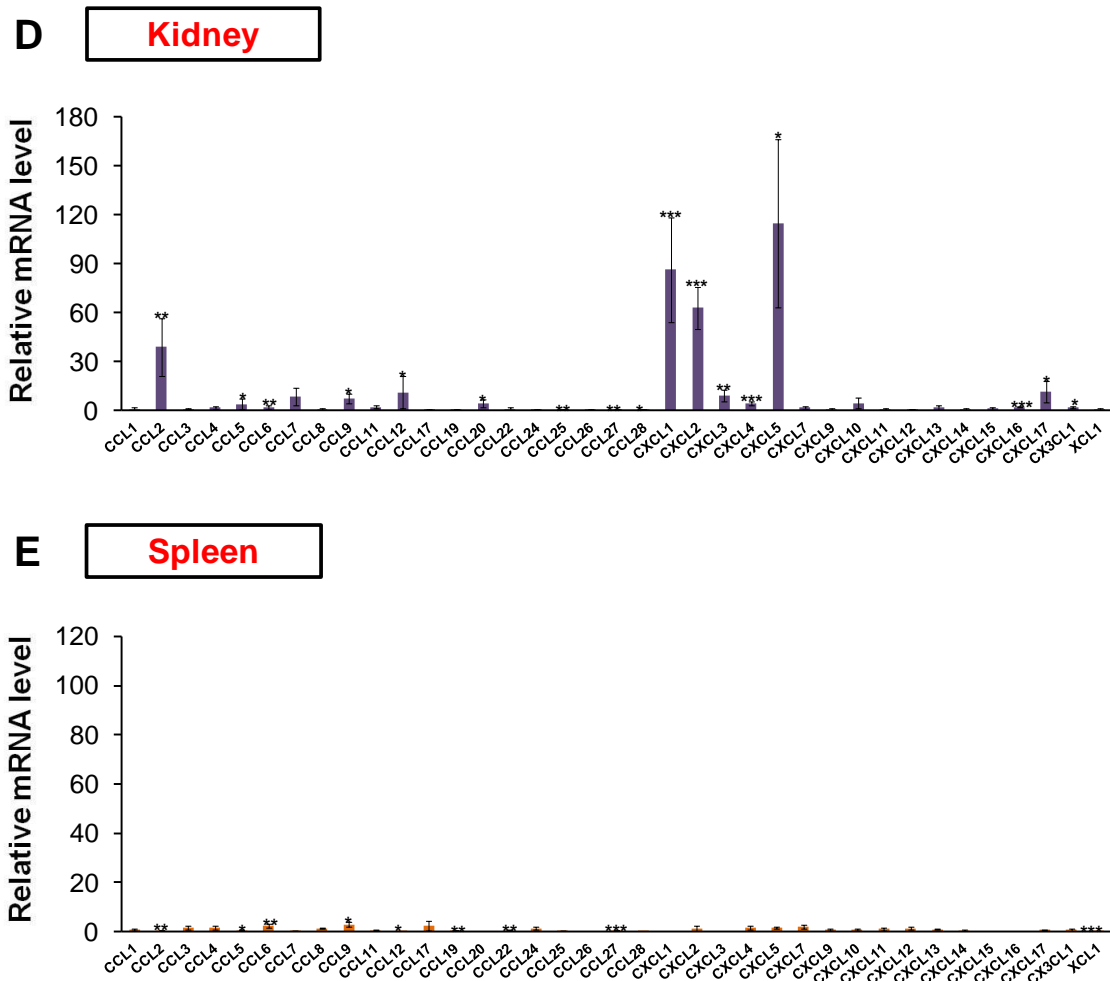


Figure 1. Effects of methylmercury on the mRNA levels of chemokines in various organs of mice. C57BL/6 mice were injected subcutaneously with MeHgCl (10 mg/kg/day) daily for 7 consecutive days. Tissues were dissected 1 day after seventh injections. Thirty-seven chemokines mRNA levels in the cerebellum (A), cerebrum (B), liver (C), kidney (D) and spleen (E) were measured by quantitative real-time PCR in MeHgCl-treated and control mice. mRNA levels were normalized to GAPDH levels. Data shown fold-changes in mRNA levels (mean \pm S.D.) * p < 0.05; ** p < 0.01; and *** p < 0.001 compared with control group. Data were analyzed using Student's t -test.

Table 2. Changes in mRNA levels of chemokines in various organs of methylmercury-treated mice.

		Cerebellum	Cerebrum	Liver	Kidney	Spleen
CC chemokines	CCL1	0.71 ± 0.28	3.54 ± 2.00	ND	1.14 ± 0.76	0.70 ± 0.44
	CCL2	22.31 ± 11.73*	20.57 ± 10.74**	1.25 ± 0.57	39.12 ± 17.77**	0.37 ± 0.13**
	CCL3	75.34 ± 44.42**	51.70 ± 16.65***	1.42 ± 0.30	1.18 ± 0.48	1.53 ± 0.82
	CCL4	70.39 ± 22.63***	72.54 ± 45.02*	2.24 ± 1.17	1.89 ± 0.71	1.58 ± 0.77
	CCL5	7.63 ± 4.24*	2.46 ± 1.09*	4.18 ± 1.06**	4.16 ± 3.07	0.49 ± 0.29*
	CCL6	3.26 ± 1.08**	1.81 ± 0.62	8.56 ± 4.07**	2.17 ± 0.99*	2.35 ± 0.72**
	CCL7	10.13 ± 5.89**	14.03 ± 7.71**	5.51 ± 2.93	8.65 ± 5.23*	0.22 ± 0.09
	CCL8	1.62 ± 0.59	1.77 ± 1.07	4.19 ± 3.04	0.95 ± 0.70	1.33 ± 0.15
	CCL9	6.32 ± 2.91**	3.63 ± 1.99*	1.18 ± 0.51	7.65 ± 2.94**	2.89 ± 1.07*
	CCL11	3.32 ± 1.01**	6.02 ± 3.93*	0.34 ± 0.23	2.27 ± 0.97	0.57 ± 0.29
	CCL12	31.05 ± 19.41**	63.09 ± 34.88**	1.81 ± 1.92	11.36 ± 9.65*	0.02 ± 0.01*
	CCL17	2.82 ± 0.68**	5.68 ± 2.54**	1.03 ± 0.66	0.57 ± 0.36	2.32 ± 1.96
	CCL19	1.38 ± 0.24*	1.57 ± 0.39*	1.20 ± 0.56	0.59 ± 0.23	0.37 ± 0.16**
	CCL20	ND	1.19 ± 0.38	ND	4.47 ± 2.65*	ND
	CCL22	1.95 ± 0.77*	2.22 ± 0.37**	1.13 ± 0.72	1.01 ± 0.79	0.39 ± 0.19**
	CCL24	1.17 ± 0.57	1.07 ± 0.23	2.25 ± 0.87*	0.81 ± 0.36	1.35 ± 0.54
	CCL25	1.48 ± 0.44	1.17 ± 0.32	0.52 ± 0.37	0.62 ± 0.14**	0.31 ± 0.17
	CCL26	1.41 ± 0.67	0.80 ± 0.33	2.63 ± 1.36*	0.71 ± 0.21	ND
	CCL27	1.17 ± 0.87	0.65 ± 0.15**	0.98 ± 0.35	0.50 ± 0.20**	0.36 ± 0.12***
	CCL28	1.11 ± 0.36	1.17 ± 0.48	1.41 ± 0.35	0.54 ± 0.13*	0.09 ± 0.01
CXC chemokines	CXCL1	7.60 ± 5.79	4.64 ± 2.95	3.83 ± 0.51**	86.50 ± 32.02***	ND
	CXCL2	4.84 ± 3.23	4.37 ± 2.48	3.70 ± 2.80	63.07 ± 12.72***	1.11 ± 1.09
	CXCL3	ND	ND	ND	9.19 ± 3.40**	ND
	CXCL4	0.82 ± 0.29	0.80 ± 0.36	2.57 ± 1.59	4.69 ± 1.29***	1.71 ± 0.79
	CXCL5	12.72 ± 5.89**	2.64 ± 1.37*	0.78 ± 0.56	115.06 ± 51.56*	1.47 ± 0.30
	CXCL7	2.07 ± 0.58	7.50 ± 6.82	2.76 ± 1.29*	1.80 ± 0.80	1.92 ± 0.64
	CXCL9	5.28 ± 4.35	0.86 ± 0.82	0.57 ± 0.34	0.86 ± 0.60	0.79 ± 0.48
	CXCL10	20.46 ± 11.76*	50.59 ± 28.52*	0.47 ± 0.21	4.53 ± 3.33	0.69 ± 0.44
	CXCL11	1.01 ± 0.18	0.62 ± 0.27	0.76 ± 0.19	0.88 ± 0.44	0.99 ± 0.61
	CXCL12	1.05 ± 0.34	0.89 ± 0.17	1.67 ± 0.50*	0.90 ± 0.23	1.35 ± 0.48
	CXCL13	0.89 ± 0.16	ND	5.66 ± 4.27	1.87 ± 1.37	0.84 ± 0.21
	CXCL14	1.41 ± 0.39	0.78 ± 0.25	5.12 ± 2.69*	0.95 ± 0.40	0.42 ± 0.38
	CXCL15	ND	ND	ND	1.28 ± 1.09	ND
	CXCL16	2.21 ± 0.52**	2.17 ± 1.00*	1.85 ± 0.60*	2.26 ± 0.35***	ND
	CXCL17	ND	ND	ND	11.69 ± 6.52*	0.71 ± 0.20
CX₃C chemokines	CX₃CL1	1.05 ± 0.17	0.84 ± 0.46	3.45 ± 1.82	2.20 ± 0.53**	0.63 ± 0.27
C chemokines	XCL1	ND	ND	2.26 ± 1.82	0.94 ± 0.38	0.007 ± 0.002***

See the legend to Figure 1.

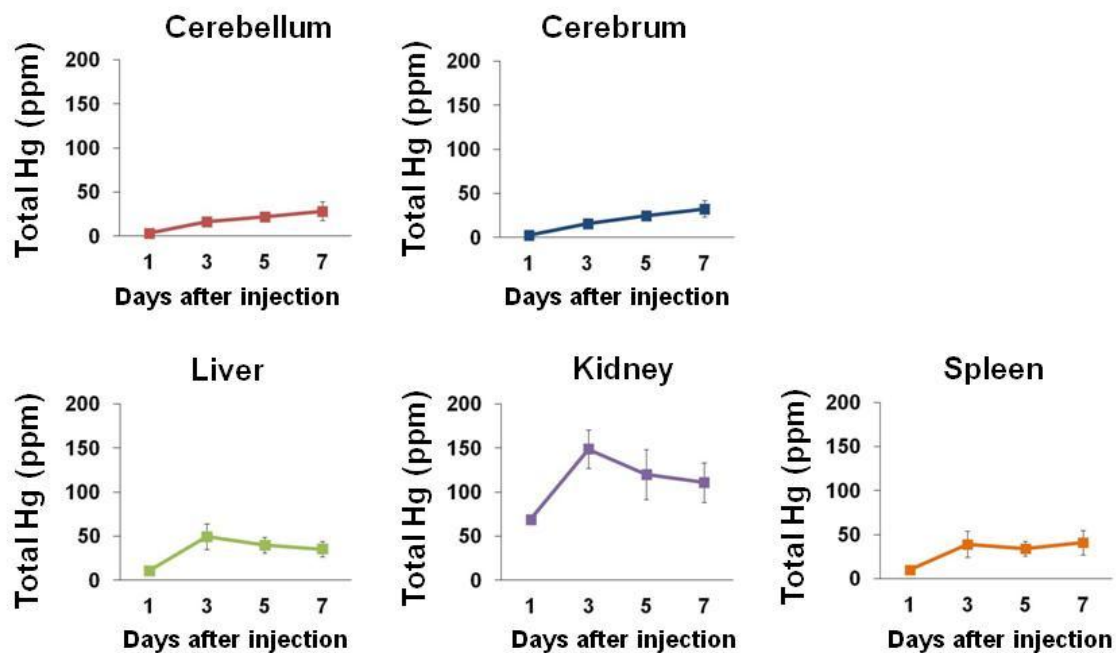


Figure 2. Mercury accumulation in various organs of MeHgCl-treated mice. C57BL/6 mice were injected subcutaneously with MeHgCl (10 mg/kg/day) daily for 7 consecutive days. Selected tissues were dissected 1 day after first, third, fifth and seventh injections. Levels of mercury in tissues were measured by RA-915+ mercury analyzer. Data are presented as mean \pm S.D.

2. メチル水銀によって脳組織特異的に発現誘導されるケモカイン分子種の検索

1. での検討により、CCL3、CCL4 および CXCL10 がメチル水銀によって脳特異的に発現誘導される可能性が示された。そこで、これら 3 種のケモカインの発現変動を経時的に検討した。その結果、3 つのケモカインの中で、CXCL10 はメチル水銀投与によって腎臓中においても有意な発現上昇を示したが (Figure 3C)、CCL3 および CCL4 については脳以外の組織での有意な発現上昇は認められなかった (Figure 3A、3B)。したがって、メチル水銀は CCL3 および CCL4 を脳組織特異的に発現誘導すると考えられる。

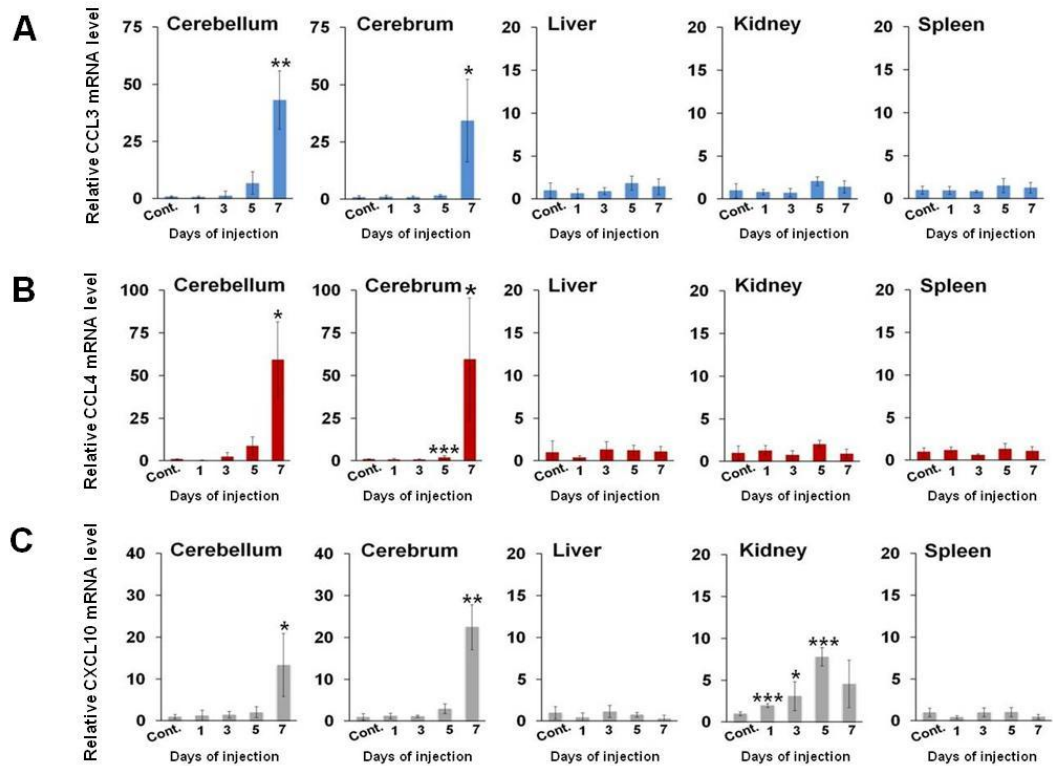


Figure 3. Effects of methylmercury on the mRNA levels of CCL3, CCL4 and CXCL10 in various organs of mice. C57BL/6 mice were injected subcutaneously with MeHgCl (10 mg/kg/day) daily for 7 consecutive days. Selected tissues were dissected 1 day after first, third, fifth and seventh injections. mRNA levels of CCL3 (A), CCL4 (B) and CXCL10 (C) in the cerebellum, cerebrum, liver, kidney and spleen were measured by quantitative real-time PCR. For further details, see the legend to Figure 1.

第四節 考察

本章での検討により、メチル水銀が CCL3 および CCL4 を脳組織特異的に発現上昇させることが明らかになった。メチル水銀が肝臓および腎臓中よりも低い濃度で脳中での CCL3 と CCL4 の発現を誘導することから、脳中にはメチル水銀によって選択的に活性化される発現誘導機構が存在する可能性も考えられる。なお、これまでにメチル水銀によって脳特異的に発現誘導される蛋白質についての報告はなく、本知見が初めての例である。

CCL3 および CCL4 はそれぞれ macrophage inflammatory protein (MIP) 1 α および MIP1 β と呼ばれ、マクロファージから産生される炎症性蛋白質として同定されたケモカインである (Maurer and von Stebut, 2004)。両ケモカインは、共通のケモカイン受容体 (CCR1、CCR5) に結合し、白血球の浸潤や活性化に関与することが知られている (Ren *et al.*, 2010)。CCL3 および CCL4 は、中枢神経系ではグリア細胞やアストロサイト細胞から分泌され、様々な中枢神経系疾患 (多発性硬化症、虚血性脳疾患、アルツハイマー病など) の進行に関与している可能性が示唆されているが、脳内における機能についてはほとんど解明されていない (Xia *et al.*, 1998; Boven *et al.*, 2000; Cowell *et al.*, 2002; Szczuciński and Losy, 2007)。今後、脳組織における CCL3 および CCL4 の機能が明らかにされることによって、メチル水銀が示す中枢神経系選択的な毒性発現機構の解明に繋がる重要な手掛かりが得られるかもしれない。

第四章 メチル水銀毒性とケモカイン発現誘導との関係

第一節 目的

第三章で述べたように、メチル水銀によって脳特異的に発現誘導される蛋白質として2種のケモカイン（CCL3 および CCL4）が同定された。両ケモカインはマクロファージにおいて lipopolysaccharide（LPS）や過酸化水素などの薬毒物によって誘導合成され、白血球の遊走や浸潤を促進させることが知られている（Proffitt *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1996; Wiesner *et al.*, 2010）。しかしながら、メチル水銀をはじめとする薬毒物の細胞毒性と両ケモカインとの関係について検討した報告はほとんどない。そこで本章では、培養細胞およびマウスを用いて、メチル水銀が示す毒性とケモカイン誘導との関係を検討した。

第二節 実験材料および実験方法

1. 実験材料

- 生物材料

C57BL/6NCr、雄マウス

マウス培養細胞：マウス神経前駆細胞 C17.2 細胞

- 器具材料

1.5 mL、0.5 mL tube : Tokyo Wstson

Microtest tissue clture plate (6-well, 12-well, 96-well) : Falcon

Tissue culture dish 100×20 mm : Greiner

- 機器材料

定量 PCR 装置 : Thermal Cyclor Dice (Takara)

CO₂ incubator : Astec

蛍光マイクロプレートリーダー : Molecular Devices

分光光度計 : ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop)

Cell counter : Vi-CELL (Beckman Coulter)

Sonicator : Sonifier 450 (Brason)

電気泳動装置 : Bio Craft

Transfer 装置 : semi-dry (Nippon-eido)

Immunoblotting 検出装置 : Versa Doc Model 5000 (Bio-rad)

- Immunoblotting 関連抗体

Anti- α actin : Santa Cruz Biotechnology

Anti-Caspase cleaved-3 : Cell signaling

Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG : Dako Cytomation

- 試薬

Methylmercuric chloride : 関東化学

Nuclease free water : Qiagen

Ethanol : Nacalai

2-propanol : Nacalai

Acrylamide : Wako

Bromophenol blue : Wako

2-Mercaptoethanol : Nacalai

Methanol : Nacalai

N-N'-Methylenebis-acrylamide : Wako

Skim milk : 森永乳業

Sodium azide (NaN_3) : Nacalai

Sodium chloride : Nacalai

Sodium dodecyl sulfate (SDS) : Nacalai

Tris hydroxymethyl aminomethane : Nacalai

Glycine : Wako

Glycerol : Wako

Blocking Solution (TBS) : Nacalai

Immobilon Western : Millipore

AlamarBlue solution : Biosource

CCL3 siRNA, CCL4 siRNA : Sigma-aldrich

Mouse Recombinant CCL2 : R&D syatem

Mouse Recombinant CCL4 : R&D syatem

Protease inhibitor cocktail : Roche Diagnostics

Phosphatase inhibitor cocktail II : Sigma

Phosphatase inhibitor cocktail III : Sigma

HiperFect transfection reagent : Qiagen

siRNA suspension buffer : Qiagen

Poly-D-lysine : Sigma

B27 : Invitrogen

AraC : Wako

Papain : Worthington

- Medium 関連

Dulbecco's modified Eagle medium : 日水製薬

Opti-MEM : Invitrogen

Fetal bovine serum : Biowest

Penicillin-Streptomycin : Invitrogen

10×D-PBS(-) : Wako

Neurobasal A : Invitrogen

DM (dissociation medium) : 8 mM HEPES、81.8 mM Na₂SO₄、30 mM K₂SO₄、0.25 mM

CaCl₂、20 mM Glucose、12 mM MgCl₂

- Buffer 関連

RIPA buffer: 1 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1% NP-40、0.1% Sodium deoxycholate、0.1% SDS、150 mM NaCl、1 mM EDTA、protease inhibitor、Phosphatase inhibitor cocktail 1 and 2

Hypotonic buffer : 10 mM HEPES-KOH (pH7.9)、10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.5 mM PMSF、Protease inhibitor、Phosphatase inhibitor cocktail 1 and 2

Nuclear lysis buffer : 20 mM HEPES-KOH (pH7.9)、400 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.2 mM PMSF、5% Glycerol、Protease inhibitor、Phosphatase inhibitor cocktail II and III

濃縮ゲル調製用 buffer : 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.4% SDS

分離ゲル調製用 buffer : 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、0.4% SDS

2×Sample buffer : 12.5% 濃縮ゲル調製用 buffer、10% glycerol、2 % SDS、5% 2-mercaptoethanol、bromophenol blue

Transfer buffer : 25 mM Tris、250 mM glycine、20% methanol

- キット

PrimeScript RT reagent Kit : Takara

SYBR Prime Ex Taq (Perfect Real Time) : Takara

2. 実験方法

2-1. マウスへのメチル水銀の投与

<メチル水銀の投与条件 1 (濃度依存性の検討) >

体重 20~22 g の 7 週齢の C57BL/6NCr 雄マウスに 0、5、10、20、25 mg/kg bw

となるように塩化メチル水銀溶液を 1 回皮下注射し、5 日目後、マウスの小脳、
大脳、肝臓、腎臓および脾臓を摘出した。

<メチル水銀の投与条件 2（経時的変化の検討）>

体重 20~22 g の 7 週齢の C57BL/6NCr 雄マウスに 25 mg/kg bw となるように塩
化メチル水銀溶液を 1 回皮下注射し、投与後、1 日目、3 日目、5 日目、7 日目
のマウスの小脳、大脳、肝臓、腎臓および脾臓を摘出した。

2-2. Total RNA の抽出（マウス）

第二章と同じ方法で行った。

2-3. Total RNA の抽出（培養細胞）

500 μ L の ISOGEN II を加えて細胞を回収後、H₂O 200 μ L を加え、ボルテック
スし、10 分間 incubation した。8,000 \times g、15 分間遠心した。その後、上清 200 μ L
に 2-propanol を 200 μ L 加えて、混和し、12,000 \times g、10 分間遠心した。沈殿物を
500 μ L の 75%エタノールで二回洗浄し、RNase free water を 10~20 μ L 加えた。
逆転写反応および定量 PCR は第二章と同じ方法で行った。

2-4. メチル水銀を処理した細胞の生存率検討

C17.2 細胞（ 4×10^5 cells/well）を 6-well plate に播き、37°C、5% CO₂ 下で 18
時間培養した後、10 μ M 塩化メチル水銀で 6 時間処理した。その後、培地中に浮
遊している細胞と plate に接着している細胞を回収し、1 \times PBS で wash した後、
Vi-CELL（trypan blue 染色法）を用いて細胞生存率を測定した。

2-5. siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性の検討

98.3 μL の Opti-MEM に 13.4 μL の HiPerfect Reagent を滴下し、室温で 5 分間静置した。そこに 4 μM siRNA 溶液を 13.4 μL (final : 20 nM) を添加し、10 分間インキュベートした。この溶液を C17.2 細胞 (5.5×10^5 cells / 2.7 mL D'MEM) 懸濁液に滴下し、室温で 15 分間放置した。その後、 1×10^4 cells / 90 μL D'MEM となるように 2.3 mL の D'MEM を添加し、96-well plate に播種した。細胞を 37°C、5% CO_2 下で 24 時間培養した後、MeHgCl 溶液 10 μL (final : 0、1、3、4、5、6、7 μM) を添加し、24 時間培養した。その後、MeHgCl を含む培地を取り除き、10% alamarblue を含む培地に交換し、蛍光プレートリーダーを用いて蛍光を測定した (excitation 544 nm, emission 590 nm)。

<CCL3 siRNA 配列>

CGCCAATTCATCGTTGACTTT
AGTCAACGATGAATTGGCGTT

<CCL4 siRNA 配列>

CTTTGTGATGGATTACTATTT
ATAGTAATCCATCACAAAGTT

2-6. 培養細胞からの whole cell lysate の調製

C17.2 細胞 (4×10^5 cells/well) を 6-well plate に播き、18 時間培養した後、10 μM メチル水銀存在下で 6 時間培養した。1×PBS で wash した後、1×RIPA buffer を 200 μL 加え、氷上で pitetting し、1.5 mL tube に回収した。その後、20,000×g で 30 分間遠心し、上清を cell lysate とした。Lysate 中の蛋白質濃度を、Lowry 法 (Lowry, *et al.*, 1951) に基づいた DC プロテインアッセイで定量した。Lysate に同

量の 2 × sample buffer を加え、100℃で 5 分間加熱し、SDS-PAGE 用サンプルとした。

2-7. Immunoblotting

2-6 で得られた lysate を 12.5%のポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE (30 mA/枚) を行った。その後、semi-dry 型の blotting 装置を用いて Immobilon-P transfer membrane に blotting を行った (条件 : 70 mA/枚、2 時間)。Transfer 後の membrane を blocking solution (5% スキムミルク、20 mM TBS、pH7.5) に 4℃で overnight 浸した後に、1 次抗体溶液に浸し、室温で 4 時間以上振盪した。Washing solution (0.5% スキムミルク、20 mM TBS、pH7.5) で 3 回、15 分間振盪して洗浄した後、HRP 標識二次抗体溶液に浸し、室温で 1 時間振盪した。その後、washing solution (0.5% スキムミルク、20 mM TBS、pH7.5) で 3 回、15 分間振盪して洗浄した後に、immobilon western を用いて化学発光させた。検出は Versa Doc Model 5000 で行った。

2-8. マウスの小脳の初代培養神経細胞の培養

<12-well plate のリジンコーティング>

濾過滅菌した lysine 溶液 2 mL を 12-well plate に入れ、overnight インキュベートし、コーティングした。使用前に 1 × PBS で 2 回洗浄し、lysine を除去した。

<マウスの小脳の初代培養神経細胞の培養>

生後 7 日目のマウス (6 匹) の小脳を摘出し、DM (dissociation medium) 中に入れた。はさみで小脳を小さく断片化し、スポイドで 50 mL tube に移した。小脳の断片が沈むまで放置し、その上澄みをスポイトで取り除いた。次に、papain 含む DM を 10 mL 入れて、37℃の水浴で 45 分間インキュベーションし、5 分置

に優しく invert した。DM で洗浄後、脳断片を沈殿させ、Neurobasal A で 3 回洗った。10 mL の Neurobasal A で懸濁し、 1×10^6 cells/well となるように Neurobasal A で希釈した。コーティングした 12-well plate に播き、37°C、5%CO₂ 下で 2 時間培養した後、Neurobasal A (2% B27、1% FBS、25 mM KCl を含む) に交換した。二日後に AraC (final : 5 μ M) を添加し、2-3 日一回、50%の培地を交換する。2 週間培養し、neuron の突起が伸びていることを確認して実験に使用した。

2-9. 培地中へのリコンビナント CCL4 の添加が細胞のメチル水銀感受性に与える影響

12-well plate 中で 2 週間培養した神経細胞にリコンビナント CCL2 または CCL4 (final : 0、1、5、10、20、50 μ g/mL) を添加し、1 間後に 120 μ L の MeHgCl 溶液 (final : 5 μ M) を処理した。24 時間後にメチル水銀を含む培地を除いて 10% alamarblue を含む培地に交換し、蛍光プレートリーダーを用いて蛍光を測定した (excitation 544 nm, emission 590 nm)。

2-10. マウス脳組織の免疫染色

マウス脳組織のパラフィン切片を作製し、抗 NeuN 抗体を用いて免疫染色を行い、NeuN 陽性細胞を検出した。なお、パラフィン切片の作製および抗 NeuN 抗体による免疫染色は、環境省 国立水俣病総合研究センター基礎研究部・毒性病態研究室・室長 藤村成剛博士のご協力のもと行った。

第三節 実験結果

1. C17.2 細胞においてメチル水銀がケモカインの発現レベルに与える影響およびメチル水銀毒性との関係

マウス脳組織由来の神経前駆細胞である C17.2 細胞においてメチル水銀がケモカインの発現レベルに与える影響を調べた。その結果、通常状態では CCL3 および CCL4 の発現は検出限界以下であったが、メチル水銀処理によって 2 時間後から両ケモカインの mRNA レベルが上昇しはじめ、9 時間後まで経時的に上昇し続けた (Figure 4A)。一方、trypan blue assay によって細胞の生存率を測定したところ、メチル水銀処理 6 時間後から細胞生存率の低下 (Figure 4B) およびアポトーシスの指標として知られているカスパーゼ 3 の活性化が認められた (Figure 4C)。したがって、メチル水銀処理した C17.2 細胞において、CCL3 および CCL4 の発現レベルは、細胞毒性が現れるよりも前に上昇すると考えられる。

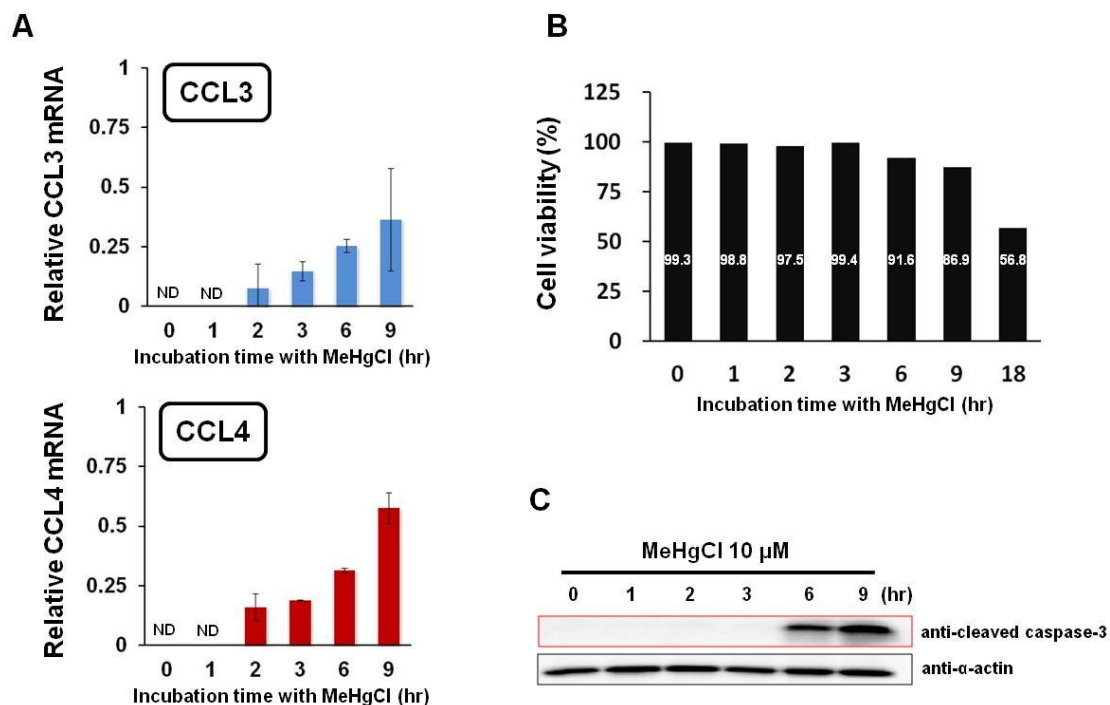


Figure 4. Effects of MeHg on cell viability and caspase-3 activity. C17.2 cells (4×10^5 cells/2 mL) were seeded onto each well of 6-well plate. After incubation 18 hr, treated with 10 μ M MeHgCl for the indicated times. **(A)** mRNA levels of CCL3 and CCL4 were measured by quantitative real-time PCR. For further details, see the legend to Figure 2. **(B)** Cell viability was determined by trypan blue assay using the Vi-CELL cell counter. **(C)** The level of cleaved caspase-3 was measured by immunoblotting. Levels of α -actin served as a loading control. ND : not detected.

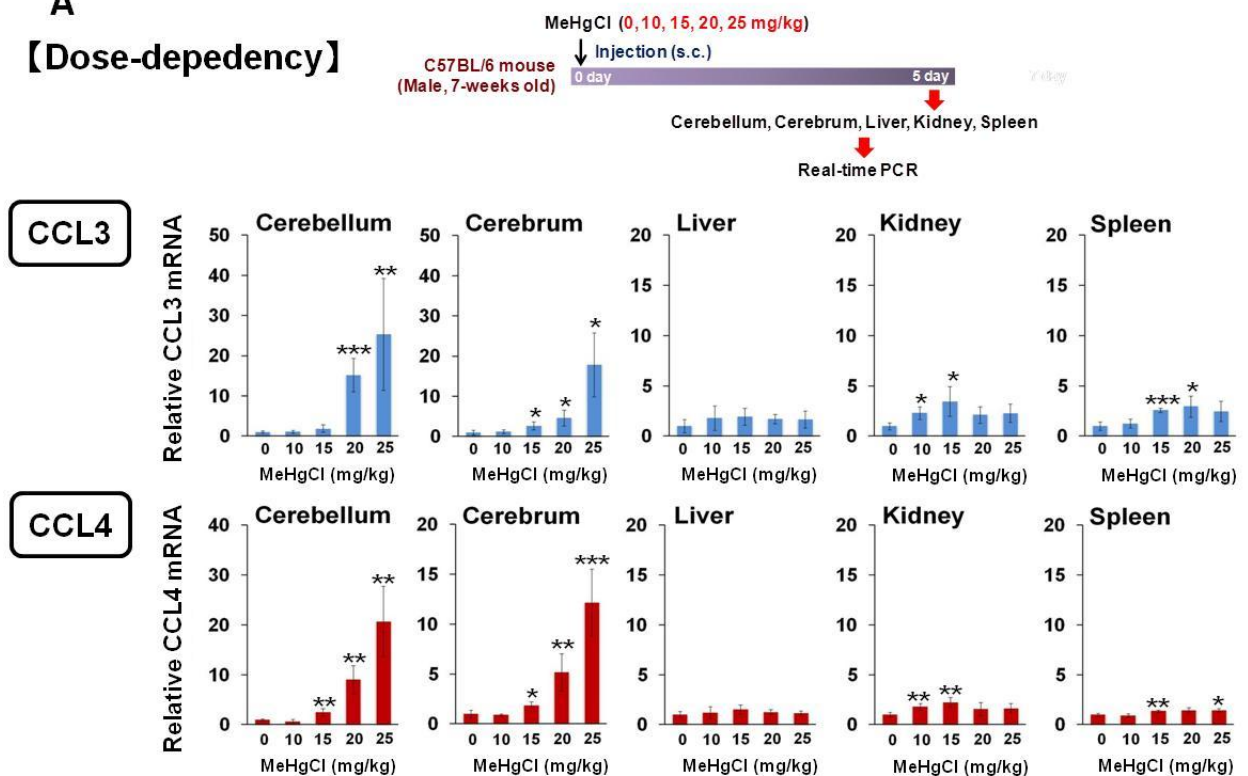
2. マウスへのメチル水銀投与による脳の病理変化とケモカイン発現誘導との関係

マウスにおけるメチル水銀毒性の発現とケモカイン発現誘導との関係を検討した。メチル水銀をマウスに単回投与して 5 日後のマウスの小脳および大脳における両ケモカインの mRNA レベルを測定したところ、投与量に依存した発現レベルの上昇が認められた (Figure 5A)。次に、25 mg/kg のメチル水銀を単回投与した後のマウスの小脳および大脳における両ケモカインの mRNA レベルの経日変化を調べたところ、5 日目以降に両ケモカインの発現レベルの上昇が認めら

れた (Figure 5B)。なお、本実験においては脳以外の組織中でも両ケモカインの発現レベルの上昇が認められたが、その程度は脳に比べれば低いものであった (Figure 5B)。一方、25 mg/kg のメチル水銀を単回投与したマウスの脳組織における病理変化を神経細胞マーカーである NeuN (Feminizing Locus on X-3; Fox-3) の陽性細胞数を指標として調べたところ、小脳においてはメチル水銀投与後 7 日目でも NeuN 陽性細胞数に変化は認められなかった (データ示さず) が、大脳においては 5 日目までは NeuN 陽性細胞数に変化は認められず、7 日目において NeuN 陽性細胞数の軽微な減少が観察された (Figure 6)。したがって、マウスの脳においてもメチル水銀による障害が認められる前に、CCL3 および CCL4 が発現誘導されると考えられる。

A

【Dose-dependency】



B

【Time-dependency】

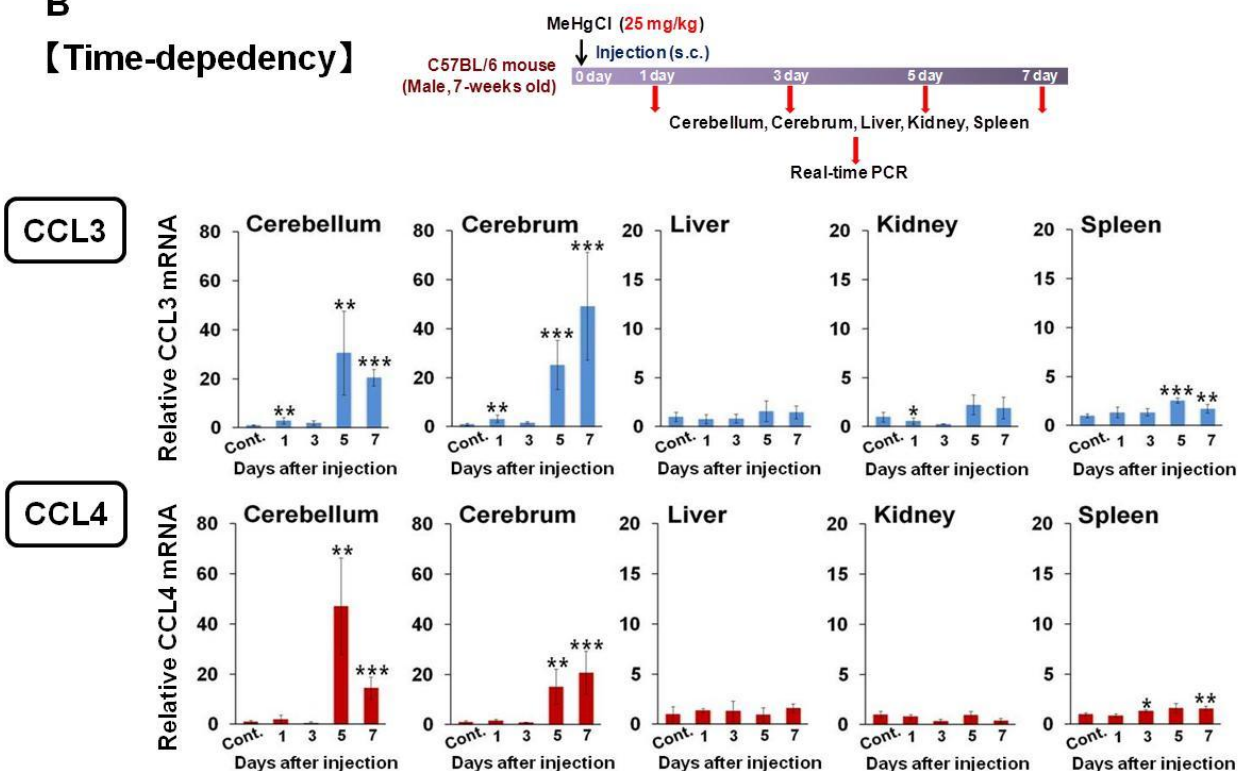


Figure 5. Effects of a single injection of MeHg on the RNA levels of CCL3 and CCL4 in the various mouse organs. C57BL/6 mice were injected subcutaneously with MeHgCl (25 mg/kg) (**A**) or MeHgCl (10, 15, 20, 25 mg/kg) (**B**). Selected tissues were dissected 1 day, 3 dyas, 5 dyas and 7 days after injection. mRNA levels of CCL3 and CCL4 in the cerebellum, cerebrum, liver, kidney and spleen were measured by quantitative real-time PCR. For further details, see the legend to Figure 1.

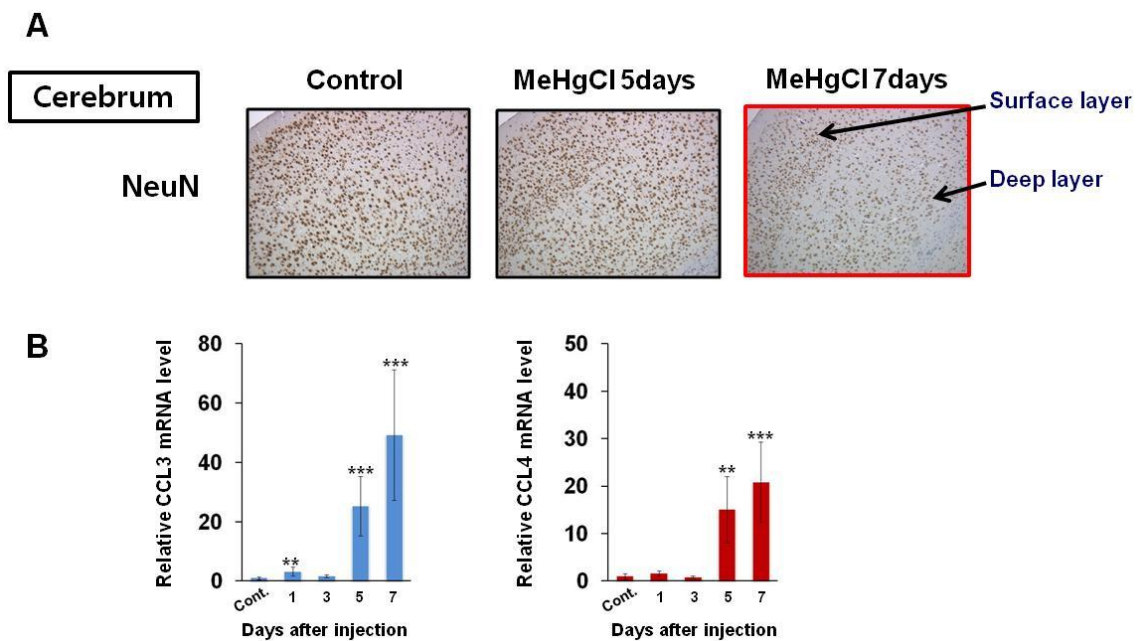


Figure 6. Effects of a single injection of MeHg on the neural cell viability in the cerebral cortex of the mouse. C57BL/6 mice were injected subcutaneously with MeHgCl (25 mg/kg). Selected brain was dissected 1 day, 3 dyas, 5 dyas and 7 days after injection. (**A**) NeuN (neuron marker)-positive cells in the brain were detected by immunostaining. Scale bars represent 250 μ m. (**B**) mRNA levels of CCL3 and CCL4 were measured by quantitative real-time PCR. For further details, see the legend to Figure 1.

3. ケモカインの培地中への添加がマウス小脳初代培養神経細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2012 年に Rostene らのグループによって、ケモカインの一種である CCL2 とメチル水銀毒性との関係性について検討した結果がはじめて報告された。Rostene らは、リコンビナント CCL2 の培地中への添加がラット初代培養神経細胞のメチル水銀感受性に与える影響を調べ、低濃度の CCL2 の添加はメチル水銀毒性を軽減し、高濃度では逆にメチル水銀毒性を増強すると報告した (Godefroy et al., 2012)。そこでマウスの初代培養神経細胞を用いて、ケモカインの培地中への添加がメチル水銀感受性に与える影響を検討した。その結果、リコンビナント CCL2 の培地中への添加によって、Rostene らの報告と同様にメチル水銀の毒性はわずかに軽減された (Figure 7A)。また、リコンビナント CCL4 を添加することによっても有意にメチル水銀毒性が軽減されたが、その程度は CCL2 と同様にあまり高いものではなかった (Figure 7B)。

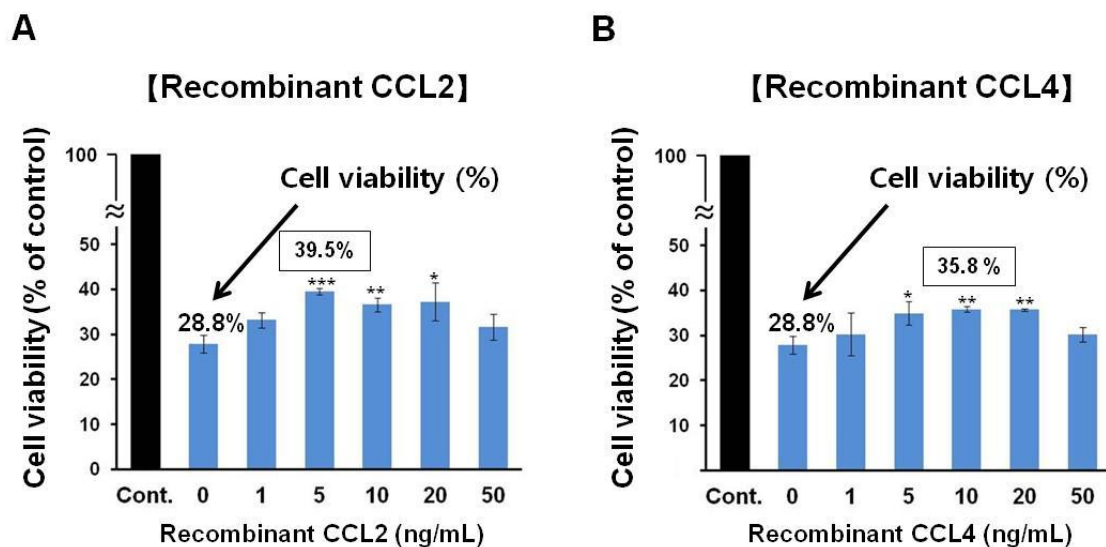


Figure 7. Effects of treatment with recombinant CCL2 or CCL4 on MeHg-induced cytotoxicity in mouse primary cerebellar granule cells. Mouse primary cerebellar granule (neuron) cells (1×10^6 cells/mL) were seeded onto 12-well plate. After incubation for 2 weeks, pre-treated with indicated concentrations of recombinant CCL2 (A) or recombinant CCL4 (B) for 1 hr. And then 5 μ M of MeHgCl was added and incubated for 24 hr. Cell viability was measured by the Alamar Bluse assay (Ex 544 nm/Em 590 nm). Data are presented as mean \pm S.D. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$ compared with the 0 ng/mL recombinant group. Data were analyzed using Student's t -test. ND: not detected.

4. C17.2 細胞における CCL3 および CCL4 の発現抑制がメチル水銀感受性に与える影響

CCL3 および CCL4 とメチル水銀毒性との関係を明らかにするため、両ケモカインの発現抑制がメチル水銀感受性に与える影響を検討した。なお、CCL3 および CCL4 の siRNA の導入によって、メチル水銀による CCL3 および CCL4 の発現誘導レベルはそれぞれ約 60%程度低下した (Figure 8B)。これら siRNA を用いて CCL3 または CCL4 をノックダウンした細胞のメチル水銀感受性を調べたところ、両ケモカインに対する siRNA を導入した細胞は共に control siRNA を導入した細胞よりも高いメチル水銀感受性を示したが、その程度はわずかだった

(Figure 8A)。したがって、CCL3 および CCL4 はメチル水銀毒性に対して防御的な作用を有しているものの、その能力はあまり高くはないと考えられる。

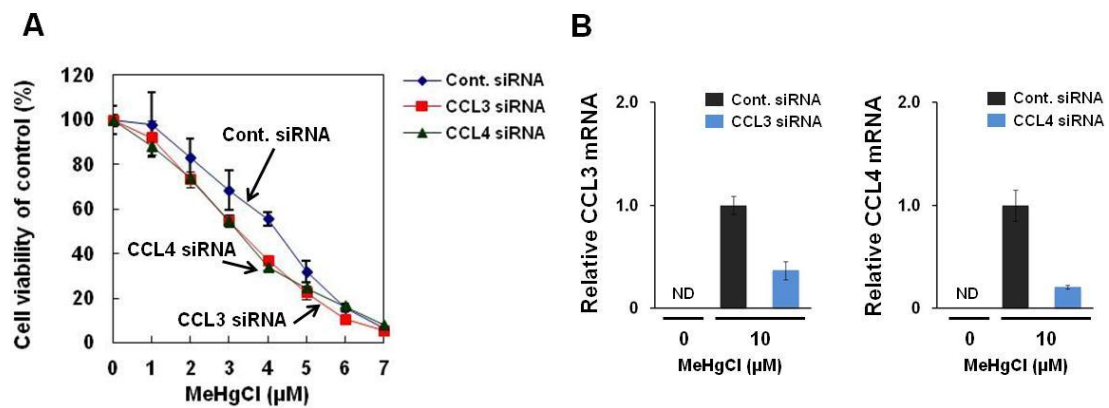


Figure 8. Effects of the knockdown of CCL3 and CCL4 on sensitivity of C17.2 cells to MeHg. (A) C17.2 cells (1×10^4 cells/90 μ L) transfected with CCL3 or CCL4 siRNA were seeded onto 6-well plate. After incubation for 18 hr, transfected cells were treated with indicated concentrations of MeHgCl for 24 hr. (A) Cell viability was measured by the Alamar Bluse assay (Ex 544 nm/Em 590 nm). (B) mRNA levels of CCL3 and CCL4 were measured by quantitative real-time PCR. For further details, see the legend to Figure 2. Data are presented as mean \pm S.D. ND: not detected.

第四節 考察

本章での神経前駆細胞およびマウスを用いた検討により、CCL3 および CCL4 の発現誘導はメチル水銀毒性が発現するよりも前に認められたことから、メチル水銀によって CCL3 および CCL4 の発現が誘導されるという現象はメチル水銀によって細胞が障害された結果ではなく、メチル水銀曝露に対する応答反応である可能性も考えられる。

我々はマウスへのメチル水銀の投与によって血清中 CCL4 レベルが上昇することを確認していることから（データ示さず）、血清中 CCL4 をメチル水銀曝露のバイオマーカーとして活用できる可能性もある。

また、本章での検討によって、CCL3 および CCL4 がわずかにメチル水銀毒性を軽減させることは示された。CCL3/4 は他のサイトカイン群（IL-1、IL-6 など）の産生を誘導することが知られている（Fahey *et al.*, 1992; Bless *et al.*, 2000; Speyer *et al.*, 2004）。最近、Koizumi らのグループは、メチル水銀によって IL-6 が発現誘導され、その IL-6 がメチル水銀による神経細胞障害に対して防御的な作用を示すことを報告した（Noquchi *et al.*, 2013）。したがって、メチル水銀によって誘導された CCL3/4 が IL-6 産生を亢進させ、メチル水銀毒性を軽減するという可能性も考えられたが、メチル水銀を投与したマウス脳中では IL-6 の誘導は認められなかった（データ示さず）。また、CCL3/4 に共通のケモカイン受容体である CCR1 および CCR5 のアンタゴニストで C17.2 細胞を前処理してもメチル水銀感受性にはほとんど変化が認められなかった（データ示さず）。CCL3/4 はこれまで知られているものとは異なる機構を介してメチル水銀毒性軽減に関与しているのかもしれない。

第五章 メチル水銀によるケモカイン発現誘導機構の解析

第一節 目的

免疫反応や炎症などに関わる遺伝子の発現調節に関わる転写因子である NF- κ B が、種々のケモカインの発現誘導に関わることが知られている (Thompson and van Eldik, 2009; Giraud *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014)。C17.2 細胞において NF- κ B のサブユニットである p65 をノックダウンしたところ、メチル水銀による CCL3 および CCL4 の発現誘導は抑制されたが、その程度はごくわずかであった (データ示さず)。したがって、メチル水銀による両ケモカインの発現誘導には NF- κ B が部分的に関与しているものの、それ以外の転写因子の寄与が高いと考えられる。そこで本章では、メチル水銀による CCL4 の発現誘導機構の解明を目指して、本誘導機構に関わる転写因子を検索するとともに、その機構解析を行った。

第二節 実験材料および実験方法

1. 実験材料

- 生物材料、器具材料、機器は第四章と同様のものを使用した。

- Immunoblotting 関連抗体

Phospho-ERK antibody : Cell Signaling

Phospho p38 antibody : Cell Signaling

Anti-LaminA/C : Cell Signaling

Anti- α actin : Santa Cruz Biotechnology

Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG : Dako Cytomation

- 試薬

Methylmercuric chloride : 関東化学

Nuclease free water : Qiagen

Ethanol : Nacalai

2-propanol : Nacalai

Acrylamide : Wako

Bromophenol blue : Wako

2-Mercaptoethanol : Nacalai

Methanol : Nacalai

N-*N'*-Methylenebis-acrylamide : Wako

Skim milk : 森永乳業

Sodium azide (NaN_3) : Nacalai
Sodium chloride : Nacalai
Sodium dodecyl sulfate (SDS) : Nacalai
Tris aminomethane : Nacalai
Glycine : Wako
Glycerol : Wako
Blocking Solution (TBS) : Nacalai
Immobilon Western : Millipore
Dulbecco's modified Eagle medium : 日水製薬
Opti-MEM : Invitrogen
Fetal bovine serum : Biowest
Penicillin-Streptomycin : Invitrogen
10×D-PBS (-) : Wako
AlamarBlue solution : Biosource
Protease inhibitor cocktail : Roche Diagnostics
Phosphatase inhibitor cocktail II : Sigma
Phosphatase inhibitor cocktail III : Sigma
HiperFect transfection reagent : Qiagen
siRNA suspension buffer : Qiagen
Lipofectamine 2000 : Invitrogen
FOXA1 siRNA : Sigma-aldrich
SRF siRNA : Sigma-aldrich
p38 inhibitor (SB203580) : Wako
ERK inhibitor (PD098059) : Wako

JNK inhibitor (SP600125) : Sigma

• Buffer 関連

RIPA buffer : 1 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1% NP-40、0.1% Sodium deoxycholate、0.1% SDS、150 mM NaCl、1mM EDTA、protease inhibitor、Phosphatase inhibitor cocktail II and III

Hypotonic buffer : 10 mM HEPES-KOH (pH7.9)、10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.5 mM PMSF、protease inhibitor、Phosphatase inhibitor cocktail II and III

Nuclear lysis buffer : 20 mM HEPES-KOH (pH7.9)、400 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.2 mM PMSF、5% Glycerol、protease inhibitor、Phosphatase inhibitor cocktail II and III

濃縮ゲル調製用 buffer : 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.4% SDS

分離ゲル調製用 buffer : 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、0.4% SDS

2×Sample buffer : 12.5% 濃縮ゲル調製用 buffer、10% glycerol、2 % SDS、5% 2-mercaptoethanol、bromophenol blue

Transfer buffer : 25 mM Tris、250 mM glycine、20% methanol

5 × binding buffer :

• キット

PrimeScript RT reagent Kit : Takara

SYBR Prime Ex Taq (Perfect Real Time) : Takara

CCL4 Quantikine ELISA kit : R&D system

Genomic DNA Purification Kit (MagExtractor) : TOYOBO

2. 実験方法

2-1. マウスへのメチル水銀投与

第四章と同じ方法で行った。

2-2. レポータージーンアッセイ

< CCL4 プロモーター解析用プラスミドの作製 >

Genomic DNA Purification Kit を用いて C17.2 細胞から genomic DNA を単離し、それを鋳型に下記のプライマーを用いて PCR 反応を行った。

反応溶液組成

Template genomic DNA : 100 ng

5 × p.s buffer : 16 μL

2.5 mM dNTP : 6.4 μL

10 μM primer (Forward and Reverse) : 1.6 μL

Prime STAR DNA polymerase : 0.8 μL

Up to 80 μL

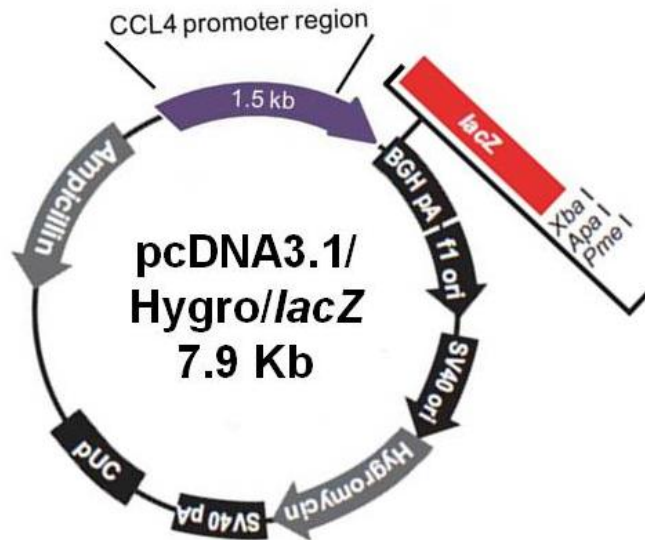
PCR 反応条件

(98°C、30 sec)

(98°C、10 sec) → (60°C、15 sec) → (72°C、30 ~ 90 sec) : 30 cycles

(72°C、60 sec)

<CCL4 プロモーター解析用プラスミド>



各プロモーター領域は下記のプライマーを用いて増幅させた。なお、Sense primer には MfeI 認識配列、Antisense primer には Hind III 認識配列を付加した。PCR 産物および pcDNA3.1/hygro/lacZ のベクターを、Mfe I および Hind III で切断した後、両者をライゲーションし、目的のプラスミド DNA を作製した。

【PCR プライマー配列】

Gene	Sense (5' → 3')	Antisense (5' → 3')
CCL4 -1,500 ~ +1bp	cggcaattgcttgaccttacttgaact	cgcaagctttgatctgagttgggaacccc
CCL4 -1,000 ~ +1bp	cggcaattgactgctctgtctttccagc	cgcaagctttgatctgagttgggaacccc
CCL4 -500 ~ +1bp	cggcaattgatgatgctgattgaatgga	cgcaagctttgatctgagttgggaacccc
CCL4 -100 ~ +1bp	cggcaattggacatcatctttactcatga	cgcaagctttgatctgagttgggaacccc
CCL4 -50 ~ +1bp	cggcaattgcttgcttaggccccagagt	cgcaagctttgatctgagttgggaacccc
CCL4 -500 ~ +101 bp	cggcaattgatgatgctgattgaatgga	cgcaagctttcagaagagttggtttagcc
CCL4 -100 ~ +51 bp	cggcaattggacatcatctttactcatga	cgcaagcttggttggggtgcaggaagga

<培養細胞へのプラスミドの導入>

C17.2 細胞 (5×10^5 cells/ 2 mL D'MEM (-penicillin/streptomycin) / well を 6-well plate に播種し、37°C、5% CO₂ 下で 18 時間培養した。その後、培地中に transfection complex 500 μ L (240 μ L Opti-MEM に 10 μ L Lipofectamin 2000 を添加したものを、5 分間室温でインキュベータした後、2 μ g DNA/ 250 μ L Opti-MEM 溶液と混和し、15 分間室温でインキュベータして調製した。) を添加し、6 時間、37°C、5% CO₂ 下で培養した後、D'MEM に(1.8 mL)交換した。37°C、5% CO₂ 下で 18 時間培養し、10 μ M または 15 μ M のメチル水銀で 6 時間処理した後、total RNA を抽出した。

2-3. siRNA を用いた発現抑制の検討

第四章、第二節 2-5 と同様の方法で行った。

<FOXA1 siRNA 配列>

No.1

GAGTTGAAGTCTCCAGCGTTT

ACGCTGGAGACTTCAACTCTT

No.2

GAATCTCAGCTGCATCGGATT

TCAGATGCAGCTGAGATTCTT

No.3

GCAACGACTGGAACAGCTATT

TAGCTGTTCCAGTCGTTGCTT

<SRF siRNA 配列>

No.1

GCTCAATTTGCTATGAGTATT
TACTCATAGCAAATTGAGCTT

No.2

CGCTACACGACCTTCAGCATT
TGCTGAAGGTCGTGTAGCGTT

No.3

CAGTGTTCCCGTCCGAGGATT
TCCTCGGACGGGGAACACTGTT

2-4. Total RNA の抽出、逆転写反応、定量 PCR

第二章と同じ方法で行った。

【定量 PCR プライマー配列】

Gene	Sense (5' → 3')	Antisense (5' → 3')
FOXA1	cactggaagcctttgaggag	aaggcaggctgagaagaaca
SRF	acgaccttcagcaagaggaa	aagccagtggcactcattct
c-fos	ccagtcaagagcatcagcaa	aagtagtcagcccggagta
FosB	gaggagctgacagatcgac	ttccttagcggatgttgacc
egr-1	gacgagttatcccagccaaa	ggcagaggaagacgatgaag
Arc	gaagtgggtgggagttaagc	ctcctcagcgtccacataca
Fos1	agagctgcagaagcagaagg	caagtacgggtcctggagaa
JunB	atgtgcacgaaaatggaaca	cctgacccgaaaagtagctg
Tpm1	gtatgaagaggtggcccgtg	cgagtttcagcctccttcag
Vinculin	cttcgatgaggctgaggttc	tggtgagtcaactcctgctg
CCL4	caaacctaaccccgagcaacac	ggctctcatagtaatccatcacaagc
GAPDH	aactttggcattgtggaagg	acacattgggggtaggaaca

2-5. 培養細胞からの whole cell lysate の調製

第四章と同じ方法で行った。

2-6. 核画分の分画

C17.2 細胞 ($4 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells) に 200 μ L の hypotonic buffer を加え、氷上で 15 分間インキュベートした。その後、10% NP-40 を 5 μ L 加え、ピペッティングし、遠心分離 ($1,500 \times g$, 5 min, 4°C) によって得られた上清を post-nuclear fraction とした。沈殿物に 50 μ L の Nuclear lysis buffer を加えて超音波処理した後、氷上で 30 分間インキュベートした。その後、遠心分離 ($15,000 \times g$, 5 min, 4°C) で得られた上清を Nuclear 分画とした。その後、第四章と同様の方法で各画分中の蛋白質濃度の定量し、SDS-PAGE、ゲルシフトアッセイ、Protein-DNA 結合アッセイのサンプルとした。

2-7. SDS-PAGE および Immunoblotting

第四章と同じ方法で行った。

2-8. 様々な阻害剤処理がメチル水銀によるケモカイン発現レベルに与える影響

C17.2 細胞 (4×10^5 cells/well) を 6-well plate に播き、18 時間培養後にそれぞれの阻害剤を添加し、 37°C 、5% CO_2 で 1 時間培養した。その後、10 μM メチル水銀で 6 時間処理し、上記の方法で total RNA を抽出した。

2-9. ゲルシフトアッセイ

< ^{32}P -Probe の作製>

CCL4 のプロモーター上の FOXA1 および SRF の両方の結合領域 (-25 bp ~ -20

bp および -28 bp ~ -19 bp) を含むオリゴ DNA (22 bp) の 5' 末端を T4 polynucleotide kinase および [γ - ^{32}P] ATP を用いて ^{32}P 標識した。

FOXA1 consensus binding site : 5'-gagtcctataaagaggggttc-3'

SRF consensus binding site : 5'-gagtcctataaagaggggttc-3'

FOXA1/SRF oligoDNA probe (22 bp) : 5'-gagtcctataaagaggggttc-3'

5 × binding buffer (phosphatase inhibitor cocktail II、III、4 mM の DTT、3 μg の Poly dI-dC を含む)、核抽出液 (5 または 10 μg) と 0.08 pmol の ^{32}P 標識したオリゴ DNA probe を混ぜ、25°C、30 分間インキュベートした。非還元ポリアクリアミドゲル (4.5%) を用いて泳動を行い、whatman 3MM ろ紙上で乾燥させ、イメージアナライザー (Typhoon FLA9500) で解析した。

2-10. Protein-DNA binding assay

FOXA1/SRF oligoDNA probe (22 bp): 5'-Biotin-gagtcctataaagaggggttc-3'

Biotin と特異的に結合する streptavidin agarose beads 30 μL と 5' 末端を biotin 標識したオリゴ DNA probe 0.8 pmol を混合し、4°C、3 時間、混和しながらインキュベーションした。そこに、核抽出液 (細胞からの抽出液 : 50 μg 、マウス組織からの抽出液 90 μg) を添加し、4°C、overnight、インキュベーションした。その後、1 × TBS buffer で 3 回洗浄し、beads に sample buffer を加え、100°C で 3 分間加熱し、2,300 × g、5 min 間室温で遠心分離し、その上清を SDS-PAGE のサンプルとした。Immunoblotting は第四章と同様の方法で行った。

第三節 実験結果

1. メチル水銀による CCL4 発現誘導に関わるプロモーター領域の特定

メチル水銀による CCL4 の発現誘導に関わるプロモーター領域をレポータージーンアッセイによって検索した。まず、CCL4 の転写開始点から上流 1,500 bp の DNA 領域の下流にレポーター遺伝子として LacZ 遺伝子を組み込み (Figure 9A)、LacZ mRNA レベルを測定することによって CCL4 のプロモーター活性を調べた。メチル水銀によって内因性 CCL4 の mRNA レベルが上昇する条件でプロモーター活性も同様に上昇することが確認され (Figure 9B)、この 1,500 bp 中にメチル水銀に応答することが確認された。そこで、プロモーター領域を段階的に短くしてプロモーター活性を測定したところ、転写開始点から上流 50 bp の DNA 領域のみでもメチル水銀によるプロモーターの活性化が認められた (Figure 9C)。また、CCL4 のプロモーター 100 bp もしくは 500 bp のうち、-50~+1 bp の領域を除去することによってメチル水銀によるプロモーターの活性化がほとんど認められなくなることも確認された (Figure 9D)。以上の結果から転写開始点から上流 50 bp までの領域がメチル水銀による CCL4 の発現誘導に必要であると考えられる。

A
CCL4 promoter construct

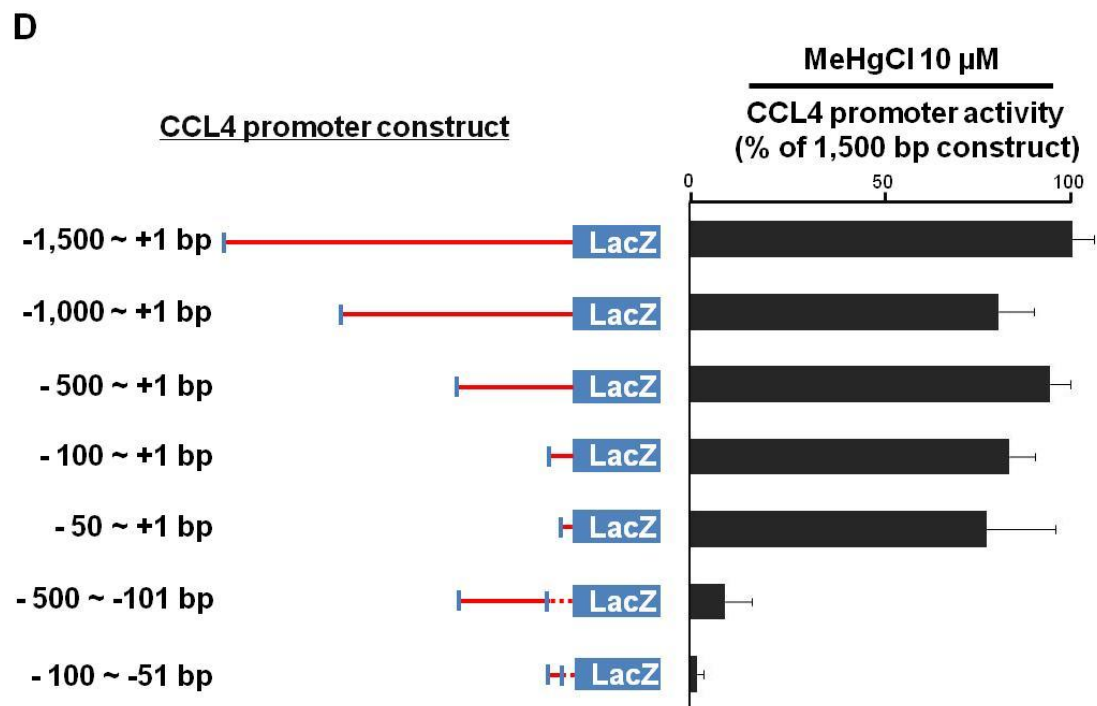
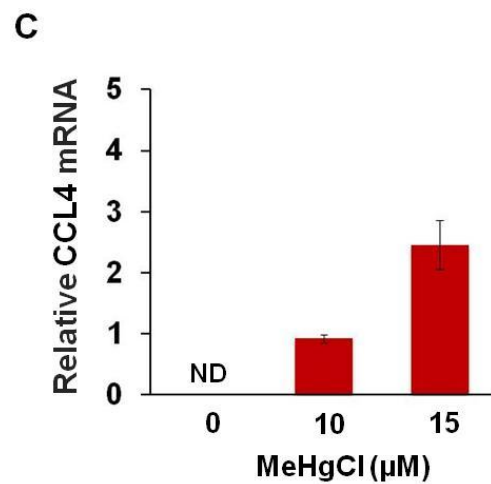
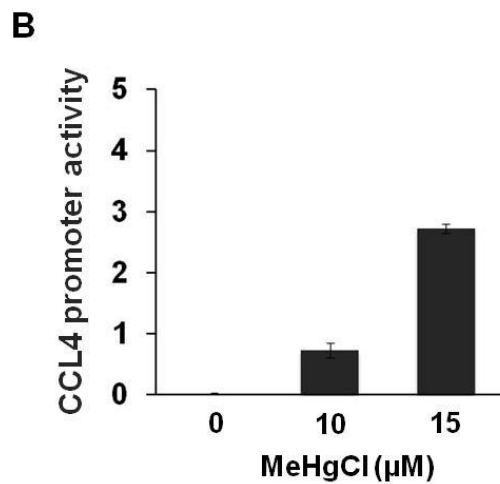


Figure 9. MeHg-responsive regions in the CCL4 promoter. (A) -1500 to +1 bp of the CCL4 promoter construct in front of the LacZ reporter gene. (B, D) C17.2 cells (5×10^5 cells/2 mL) were transfected with CCL4 promoter constructs contained fragments of different lengths. After the incubation for 18 hr, cells were treated with 15 μ M MeHgCl for 6 hr. Total RNA was extracted from in C17.2 cells treated with MeHgCl. Promoter activity was determined using quantitative real-time PCR of LacZ mRNA. (C) mRNA level of CCL4 was measured by quantitative real-time PCR. For further details, see the legend to Figure 2. Data are presented as mean \pm S.D. ND: not detected.

2. メチル水銀による CCL4 の発現誘導に関わる転写因子の検索

転写因子の結合サイトを予測する web サイト (PROMO: http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) を用いて、CCL4 のプロモーター50 bp 内に結合する可能性のある転写因子を検索したところ、10 個の転写因子が該当した (Figure 10)。そこで、この 10 種の転写因子を 1 つずつ siRNA を用いてノックダウンすることによって、メチル水銀による CCL4 の発現誘導への関与を調べた。その結果、10 種の転写因子の中で FOXA1 および SRF ノックダウンすることによってメチル水銀による CCL4 mRNA レベルの上昇が抑制されることが判明した (Figure 11)。したがって、メチル水銀による CCL4 の発現誘導に、転写因子 FOXA1 および SRF が関与している可能性が考えられる。

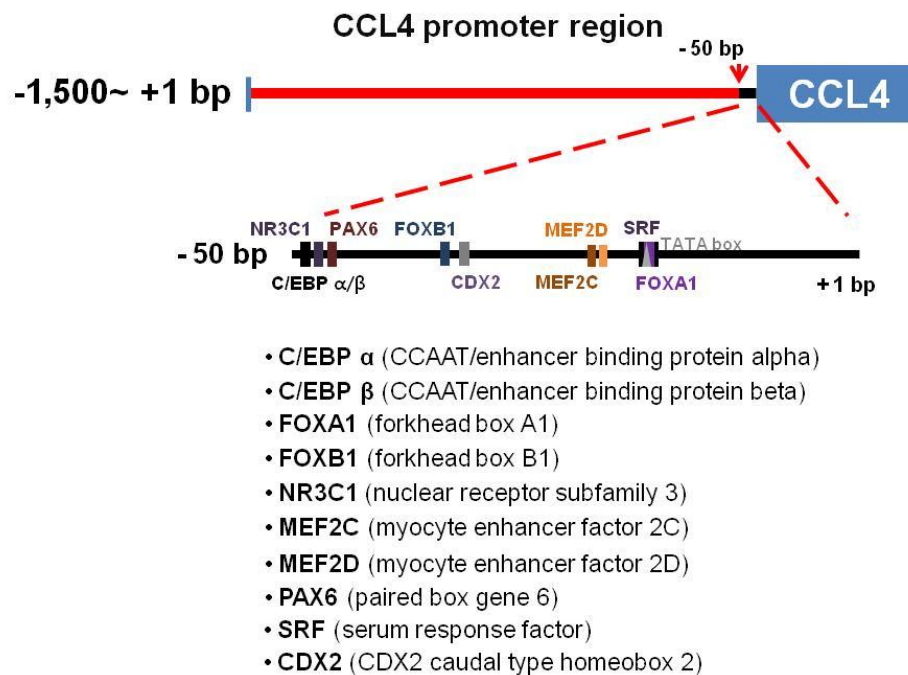


Figure 10. Potential transcription factor binding sites in the CCL4 promoter region – 50 to + 1 bp.

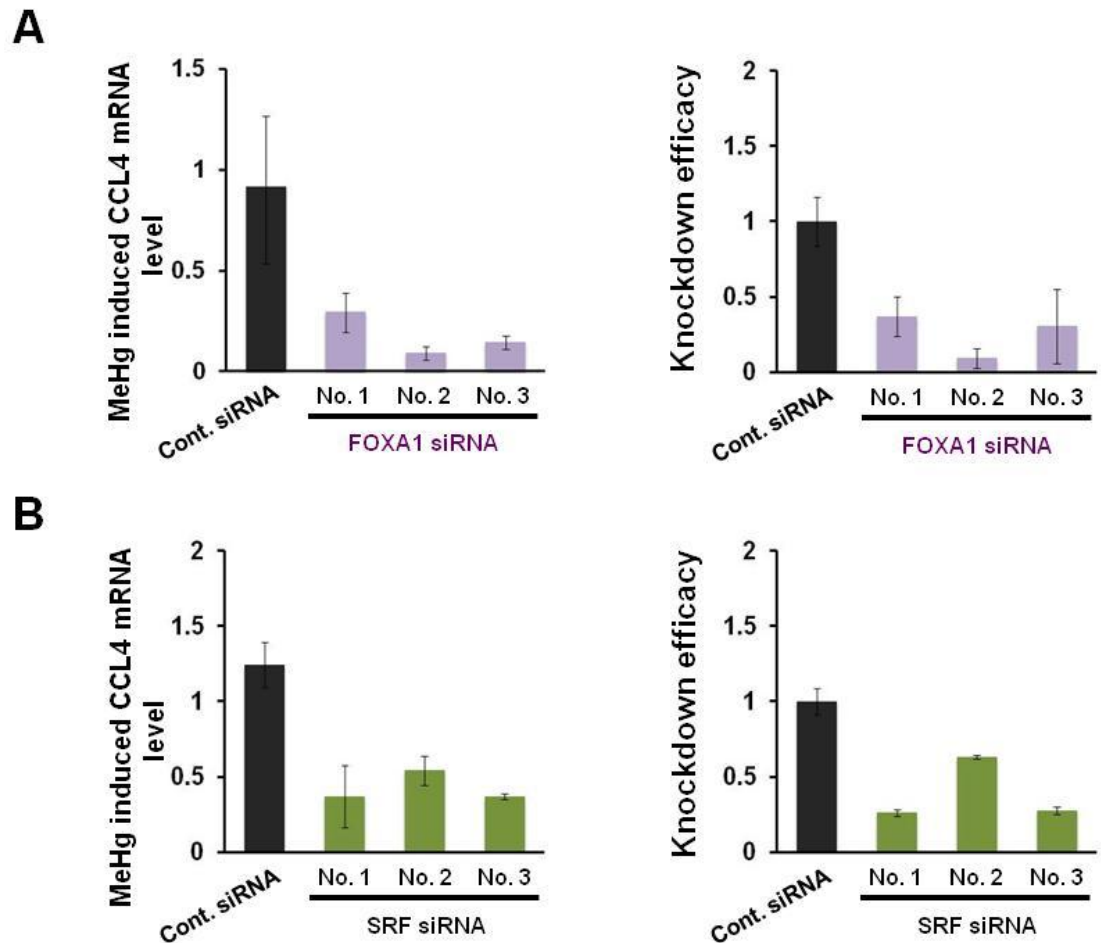
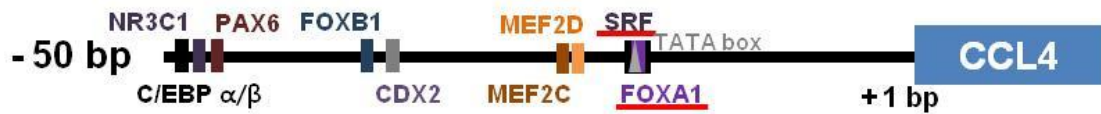


Figure 11. Effect of knockdown of Foxa1 or SRF on MeHg-induced CCL4 expression in C17.2 cells. C17.2 cells (5×10^5 cells/2 mL) transfected with FOXA1 siRNA (A) or SRF siRNA (B) were seeded onto 6-well plate. After incubation for 18 hr, the transfected cells were treated with 10 μ M MeHgCl for 6 hr, and mRNA levels were determined by quantitative real-time PCR. For further details, see the legend to Figure 2.

3. メチル水銀が FOXA1 および SRF の細胞内レベルおよび細胞内分布に与える影響

メチル水銀が FOXA1 および SRF の細胞内レベルおよび細胞内分布に与える影響を調べた。FOXA1 の細胞内レベルはメチル水銀処理によって減少したが、

核内レベルは逆に増加した。一方、SRF はメチル水銀によって細胞内レベルと核内レベルが共に増加した (Figure 12)。したがって、FOXA1 および SRF は共にメチル水銀によって核内濃度が上昇すると考えられる。

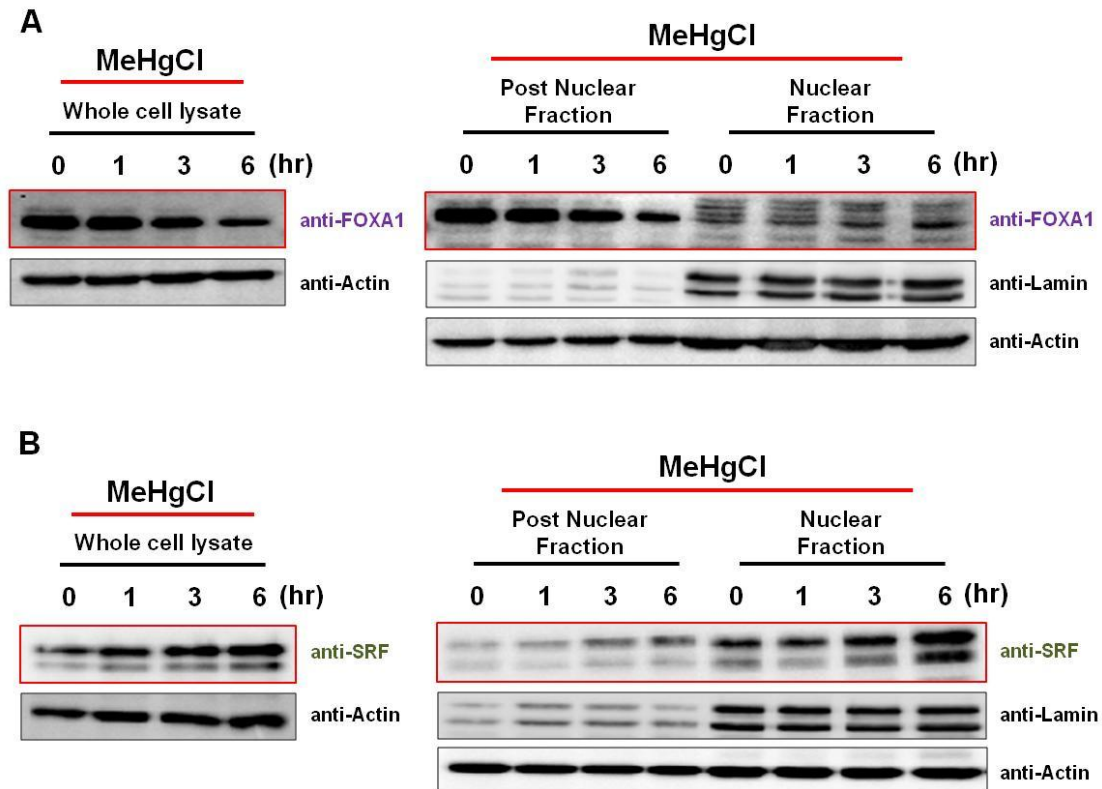


Figure 12. Effects of MeHg on nuclear translocation of FOXA1 or SRF in C17.2 cells. C17.2 cells (5×10^5 cells/2 mL) were seeded onto each well of 6-well plate. After incubation for 18 hr, cells were treated with 10 μ M MeHgCl for the indicated times. After treatment with MeHgCl, levels of FOXA1 (A) or SRF (B) in whole cell lysates and each fraction were analyzed by immunoblotting using indicated antibodies. Levels of α -actin and Lamin (nuclear fractions) served as a loading control.

4. メチル水銀が CCL4 プロモーター上への FOXA1 および SRF の結合に与える影響

FOXA1 の結合領域は SRF の結合領域に完全に含まれると考えられる。そこで、FOXA1 および SRF の両方の結合領域を含むオリゴ DNA を用いてゲルシフトアッセイを行い、メチル水銀が CCL4 プロモーター上への FOXA1 および SRF の結合量に与える影響を調べた。その結果、C17.2 細胞において、メチル水銀処理によって FOXA1 および SRF の結合配列を含む DNA 断片への結合量が増加する蛋白質の存在が認められた (Figure 13A)。また、メチル水銀投与後のマウス小脳においても、FOXA1 および SRF の結合配列を含む DNA 断片への結合量が経時的に増加する蛋白質の存在が確認された (Figure 13B)。

次に、FOXA1 および SRF の結合配列を含む DNA 断片に結合する蛋白質が、FOXA1 および SRF かどうかを確認するために、ゲルシフトアッセイに用いたプローブをビオチン標識し、そこに結合する蛋白質を streptavidin agarose beads を用いて回収して immunoblotting によって検出した。その結果、メチル水銀によって、CCL4 プロモーター上の配列への FOXA1 および SRF の結合量が増加することが示された (Figure 14)。これらの結果から、メチル水銀は FOXA1 および SRF の活性化を介して CCL4 を誘導していると考えられる。

FOXA1/SRF oligoDNA probe (22 bp): 5'-GAGTCCCTATAAAGAGGGGTTC-3'
 FOXA1 consensus binding site : 5'-GAGTCCCTATAAAAGAGGGGTTC-3'
 SRF consensus binding site : 5'-GAGTCCCTATAAAGAGGGGTTC-3'

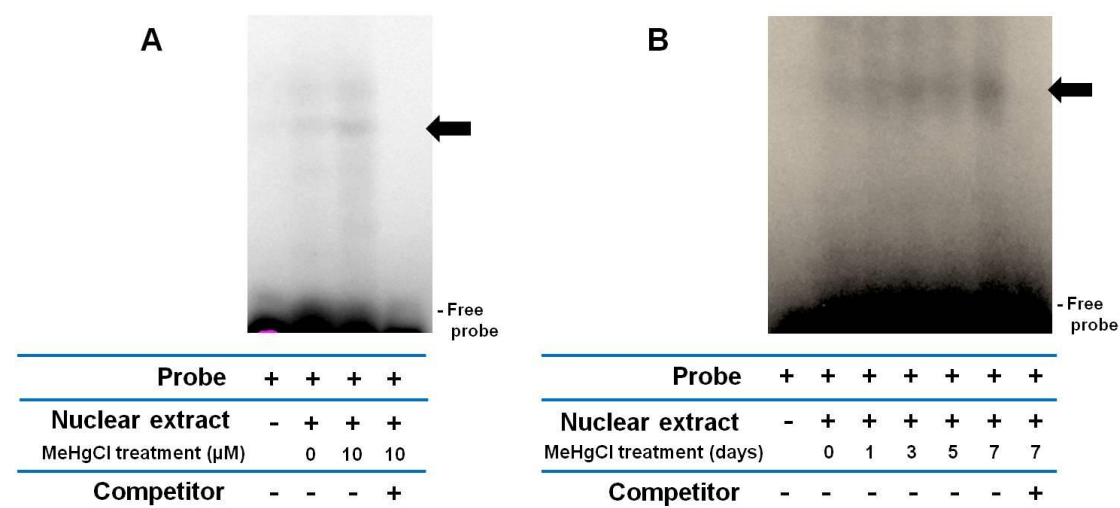


Figure 13. Effect of MeHg on FOXA1/SRF binding to -28 to -19 bp of CCL4 promoters. Nuclear fractions were isolated from MeHg-treated C17.2 cells (A) or cerebellum of mice treated with MeHgCl (B). Gel shift analysis was performed by incubating nuclear fractions with ³²P-labeled oligoDNA probe (-28 to -19 bp of CCL4 promoter). The complex of protein-³²P-labeled oligoDNA probe is indicated by a thick arrow. Competitor is a 50-fold molar excess of cold oligoDNA.

FOXA1/SRF oligoDNA probe (22 bp): 5'-**Biotin**-GAGTCCCTATAAAGAGGGGTTC-3'

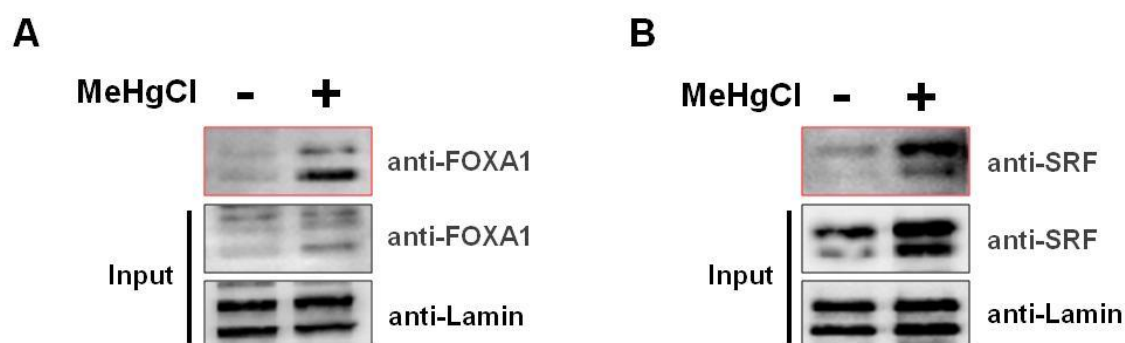


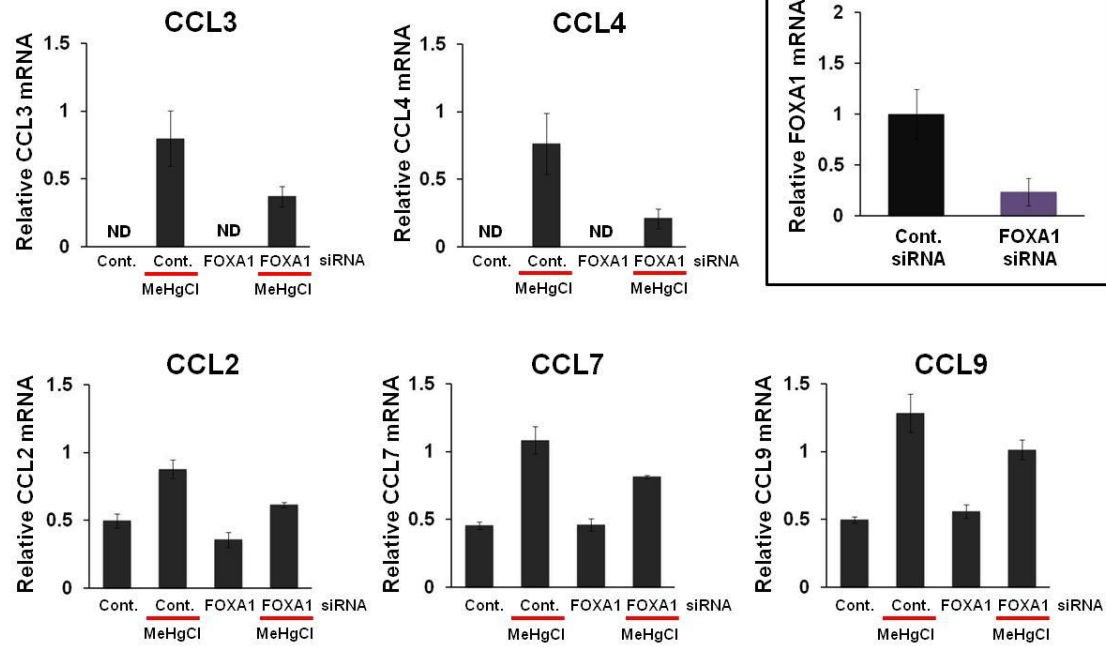
Figure 14. Effect of MeHg on FOXA1/SRF binding to FOXA1/SRF consensus of CCL4 promoter. C17.2 cells (4×10^5 cells/2 mL) were seeded onto each well of 6-well plate. After incubation for 18 hr, cells were treated with 10 μM MeHgCl for 6 hr and the nuclear fractions were isolated. FOXA1/SRF biotinylated-probe were pre-incubated with streptavidin

agarose beads, and nuclear extract was added to biotinylated-probe/streptavidin agarose beads complex. Levels of FOXA1 (A) or SRF (B) on binding to FOXA1/SRF biotinylated-probe were analyzed by immunoblotting using indicated antibodies.

5. FOXA1 および SRF の発現抑制がメチル水銀による種々のケモカインの発現誘導に与える影響

メチル水銀によって発現誘導されるケモカイン分子種の特異性決定への FOXA1 および SRF の関与を調べるために、FOXA1 および SRF の発現抑制がメチル水銀による種々のケモカインの発現誘導に与える影響を C17.2 細胞を用いて調べた。その結果、マウスにおいて脳特異的な誘導が認められた CCL3 および CCL4 の発現レベルのメチル水銀による上昇は、FOXA1 ノックダウンによって抑制されることが確認された (Figure 15A)。また、マウスにおいて脳および腎臓での発現上昇が認められた CCL2、CCL7、CCL9 もメチル水銀によってその発現レベルが上昇し、FOXA1 ノックダウンによってその上昇は部分的に抑制された (Figure 15A)。一方、SRF ノックダウンは、メチル水銀による CCL3 および CCL4 の発現誘導は抑制したが、CCL2、CCL7、CCL9 の発現誘導は抑制しなかった (Figure 15B)。以上の結果から、FOXA1 と SRF は、少なくともメチル水銀による CCL3 および CCL4 の発現誘導機構に重要な役割を果たしていると考えられる。

A



B

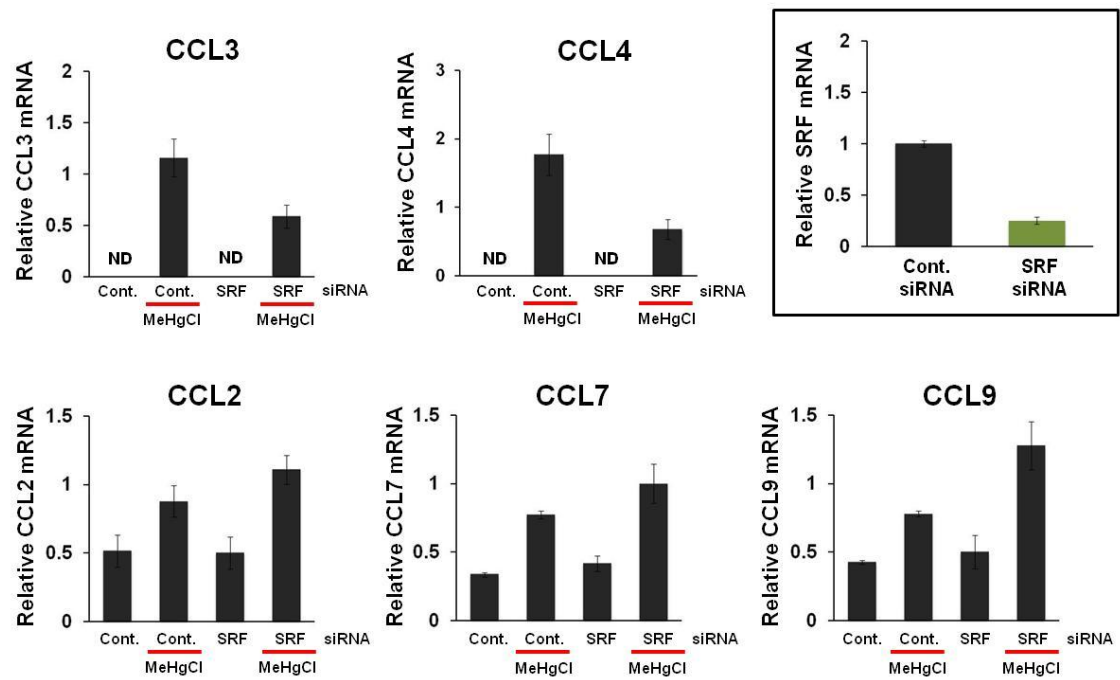


Figure 15. Effects of knockdown of FOXA1 or SRF on MeHg-induced expression of various chemokines in C17.2 cells. C17.2 cells (5×10^5 cells/2 mL) transfected with FOXA1 siRNA (A) or SRF siRNA (B) were seeded onto 6-well plate. After incubation for 18 hr, the transfected cells were treated with 10 μ M MeHgCl for 6 hr, and CCL2, 3, 4, 7, and 9 mRNA levels were determined by quantitative real-time PCR. For further details, see the legend to Figure 2. ND: not detected.

6. メチル水銀が Rho シグナル経路依存的な SRF 活性化機構に与える影響

SRF を介した転写反応は Rho シグナル経路および MAP キナーゼシグナル経路の 2 つの経路によって活性化されることが知られている (Figure 16) (Posern and Tresiman, 2006)。これら上流の活性化機構の違いによって、SRF によって転写される遺伝子群が異なることも報告されている (Selvaraj and Prywes, 2004)。そこで、メチル水銀による CCL4 の発現誘導に関わる SRF 活性化機構を調べた。メチル水銀は Rho シグナルを介して SRF 依存的に発現誘導される遺伝子 (JunB、Fos1、Tpm1 および Vcl) の発現レベルを 2 倍程度上昇させたが、その上昇は SRF をノックダウンしてもほとんど影響を受けなかった (Figure 17A)。また、アクチンの脱重合を阻害することによって Rho シグナルを抑制する Latrunculin B で処理しても、メチル水銀による CCL4 誘導はほとんど影響を受けなかった (Figure 17B)。したがって、メチル水銀は Rho シグナル経路依存的な SRF 活性化機構にはほとんど影響を与えないと考えられる。

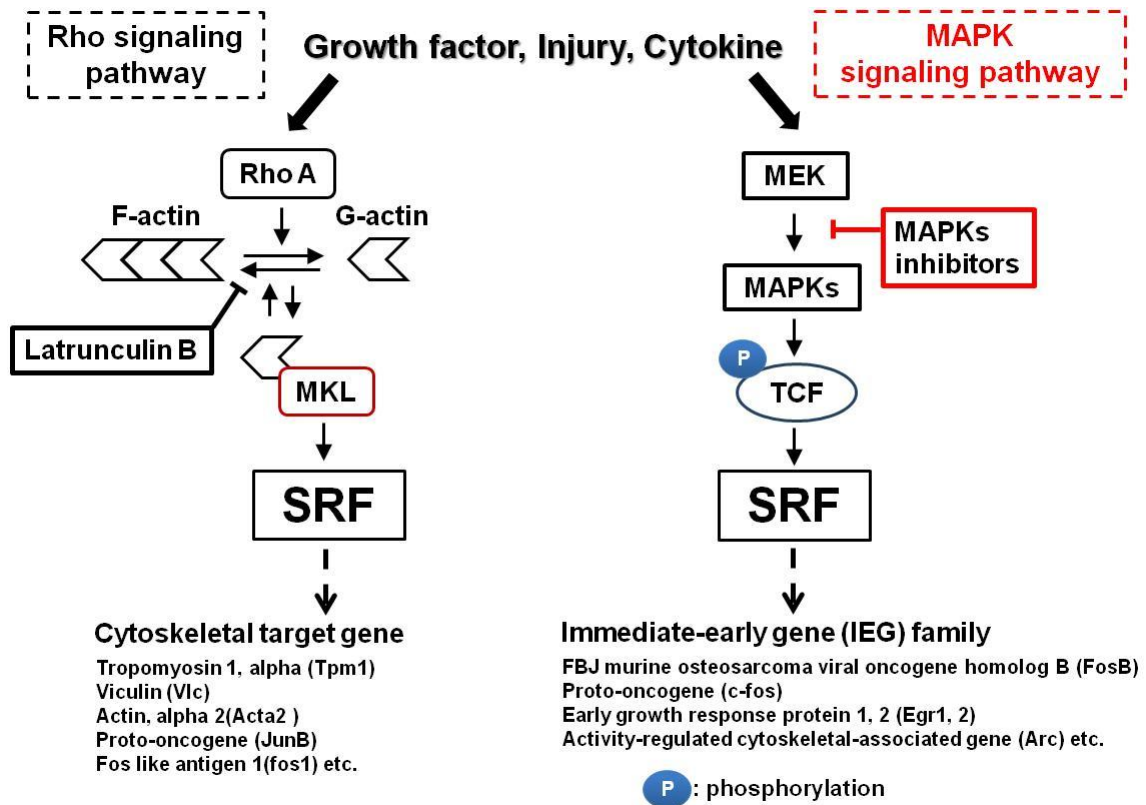


Figure 16. SRF regulate different target of gene expression through cofactor associations.

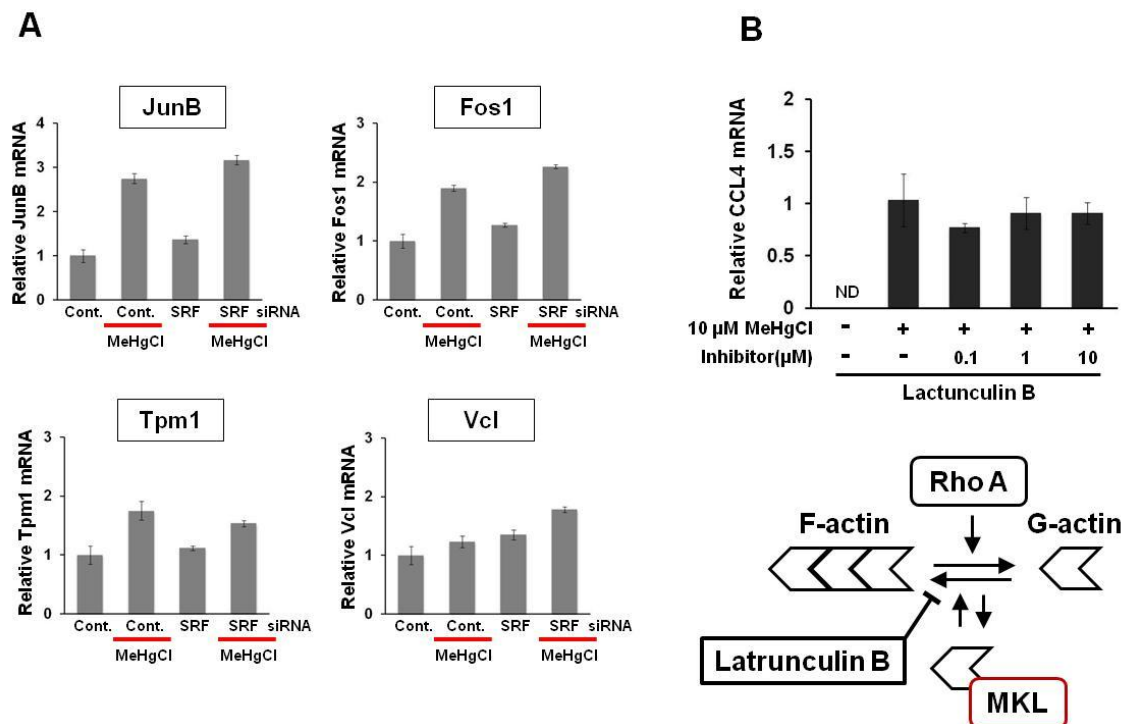


Figure 17. Effects of MeHg on the mRNA levels of SRF/MKL-regulated genes. (A) C17.2 cells (5×10^5 cells/2 mL) transfected with control siRNA or SRF siRNA were seeded onto each well of 6-well plate. After incubation for 18 hr, the transfected cells were treated with 10 μ M MeHgCl for 6 hr, and JunB, Fos1, Tpm1 and Vcl mRNA levels were determined by quantitative real-time PCR. **(B)** C17.2 cells (4×10^5 cells/2 mL) were seeded onto 6-well plate. After incubation for 18 hr, cells were pre-treated with Latrunculin B for 1 hr, and then incubated with 10 μ M MeHgCl for 6 hr. CCL4 mRNA level was determined by quantitative real-time PCR. For further details, see the legend to Figure 2. ND: not detected.

7. メチル水銀が MAP キナーゼシグナル経路依存的な SRF 活性化機構に与える影響

メチル水銀は MAP キナーゼを介して SRF 依存的に発現誘導される遺伝子 (FosB、c-fos、Egr-1 および Arc) の発現レベルを顕著に上昇させ、その上昇は SRF ノックダウンによって抑制された (Figure 18A)。また、MAP キナーゼの阻害剤がメチル水銀による CCL4 の発現誘導に与える影響を調べたところ、p38 および ERK の阻害剤によってその誘導が部分的に抑制された (Figure 18B)。また、メチル

水銀によって p38 および ERK のリン酸化が亢進することも確認された (Figure 19)。したがって、メチル水銀は p38 および ERK 依存的な SRF 転写機構の活性化を介して CCL4 の発現を誘導している可能性が考えられる。

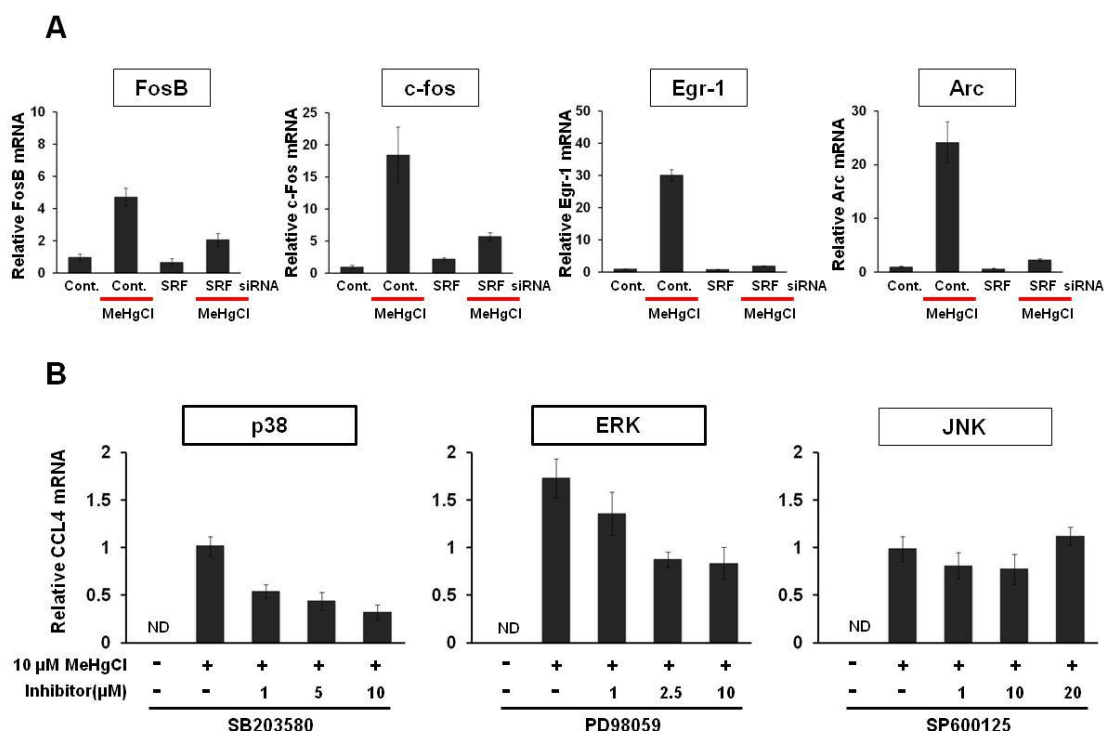


Figure 18. Effects of MeHg on the mRNA levels of SRF/TCFs-regulated genes. (A) C17.2 cells (5×10^5 cells/2 mL) transfected with control siRNA or SRF siRNA were seeded onto 6-well plate. After incubation for 18 hr, The transfected cells were treated with 10 μ M MeHgCl for 6 hr, and FosB, c-fos, Egr-1 and Arc mRNA levels were determined by quantitative real-time PCR. **(B)** C17.2 cells (4×10^5 cells/2 mL) were seeded onto 6-well plate. After incubation for 18 hr, cells were pre-treated with MAP kinase (p38, ERK, JNK) inhibitors for 1 hr, and then incubated with 10 μ M MeHgCl for 6 hr. CCL4 mRNA level was determined by quantitative real-time PCR. For further details, see the legend to Figure 2. ND: not detected.

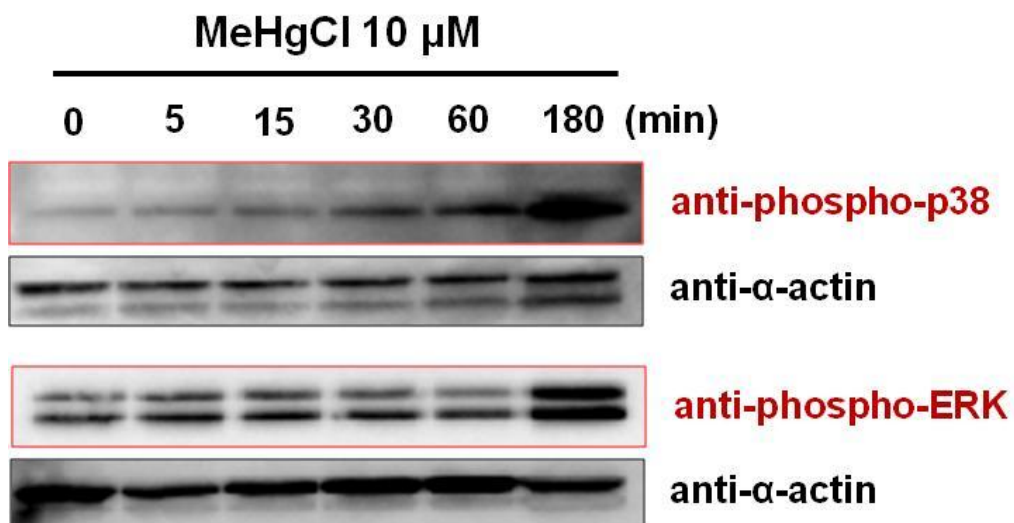


Figure 19. Effects of MeHg on the phosphorylation of p38 or ERK in C17.2 cells. C17.2 cells (4×10^5 cells/2 mL) were seeded onto each well of 6-well plate. After incubation for 18 hr, cells were treated with 10 μ M MeHgCl for the indicated times. After the treatment with MeHgCl, phosphorylated of p38 or ERK were detected by immunoblotting. Levels of α -actin protein served as a loading control.

第四節 考察

本章での検討により、メチル水銀による CCL3 および CCL4 の発現誘導に転写因子 SRF および FOXA1 が関与していることが明らかとなった (Figure 12)。SRF (serum response factor) は、MADS ボックスファミリー転写因子として、細胞骨格系遺伝子 (β -アクチン、Viculin など) や最初期遺伝子 (c-Fos、Egr-1 など) を発現誘導し、筋分化、細胞間移動、細胞形態の維持などに関与する (Miralles *et al.*, 2003; Selvaraj and Prywes, 2004; Knöll and Nordheim, 2009; Miano, 2010)。

これまでに SRF ノックアウトマウスにおいて炎症刺激によるケモカイン (CXCL1 および CXCL8) の発現上昇が低下するとの報告があるものの (Nordgren *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2014)、SRF とケモカイン誘導との関係はほとんど明らかにされていない。一方、FOXA1 (forkhead box protein A1) は、フォークヘッド型転写因子に属しており、細胞増殖に関わる遺伝子の発現を誘導する (Eeckhoutte *et al.*, 2006; Potter *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2014)。また、FOXA1 は受容体型転写因子であるエストロゲン受容体 (Estrogen reseptor; ER) を介した遺伝子発現機構においてはコファクターとして作用することも知られている (Carroll *et al.*, 2005; Laganière *et al.*, 2005)。しかしながら、これまでに FOXA1 とケモカインの発現誘導との関係についても検討例はほとんど存在しない。したがって、本研究で明らかとなった FOXA1 および SRF がメチル水銀による CCL3 および CCL4 の発現誘導に関与するという事実は、両転写因子の新しい機能を解明するうえで有用な情報になると考えられる。

また、メチル水銀は FOXA1 および SRF の核内濃度を上昇させることによって CCL4 プロモーター上への両転写因子の結合量を増加させ、その結果として CCL4 の発現を誘導することが示唆された (Figures 12-14)。これまでに SRF および FOXA1 の核内濃度に影響を与える薬物や刺激などは報告されていないが、

両転写因子がメチル水銀によって特異的に活性化される可能性も否定できない。

本章での検討により、メチル水銀による SRF 依存的な転写活性上昇に MAPK (p38 および ERK) の活性化が関与していることも判明した (Figures 19、20)。MAPK は SRF のコファクターである ternary complex factor (TCF) をリン酸化し、TCF の核内への移行を促進させることによって SRF の転写活性を上昇させることが知られている (Figure 20) (Posem and Tresiman, 2006)。中枢神経系において MAPK-TCF 経路を介した SRF の活性化が神経細胞の分化や樹状突起形成、海馬形成などに関わるとの報告もある (Vanhoutte *et al.*, 2001; Alberti *et al.*, 2004; Barrett *et al.*, 2006; Lavaur *et al.*, 2007)。マウスの各組織中では SRF 蛋白質濃度を調べたところ、SRF は腎臓や肝臓に比べて脳組織中に比較的高濃度に存在することが判明した (データ示さず)。したがって、SRF は中枢神経系において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。一方、FOXA1 はマウス胎生期において中脳の mesodiencephalic dopaminergic (mDA) 神経細胞の形成に関与することが報告されているが、中枢神経系における詳細な機能はほとんど明らかにされていない (Ferri *et al.*, 2007; Stott *et al.*, 2013)。今後、中枢神経系における SRF および FOXA1 の機能を詳細に検討することによって、メチル水銀が示す脳選択的毒性の発現機構解明のための突破口が開かれるものと期待される。

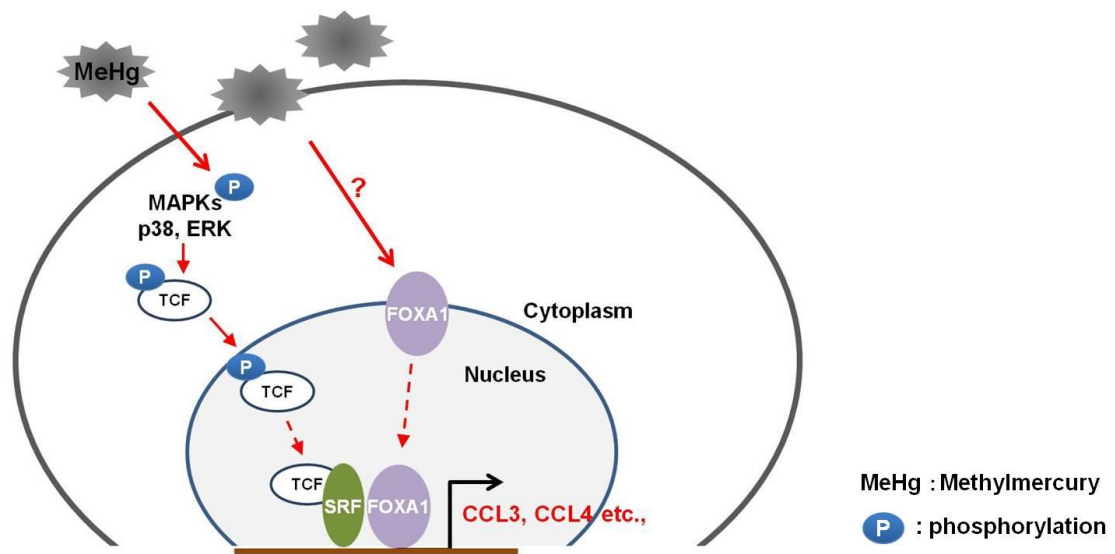


Figure 20. Induction of expression of CCL3 and CCL4 through activation of FOXA1 and SRF by MeHg in the C17.2 cells.

第六章 まとめ

メチル水銀は水俣病の原因物質として知られる環境汚染物質であり、中枢神経系に選択的かつ重篤な障害を引き起こす。しかし、その毒性発現機構はほとんど解明されていない。本研究では、メチル水銀が示す中枢神経系選択的な毒性発現機構解明の糸口を得るために、メチル水銀によって脳組織特異的に合成誘導される蛋白質の同定を試みた。

メチル水銀を投与したマウスの小脳における遺伝子の発現変動を DNA マイクロアレイ法で解析したところ、メチル水銀によって発現レベルが上昇する遺伝子が 21 種確認され、その中にはケモカインをコードする遺伝子 5 種 (CCL2、CCL4、CCL7、CCL9 および CCL12) が含まれていた。マウスのケモカインは 37 種類が同定されていることから、次に、メチル水銀投与によるマウス組織 (大脳、小脳、腎臓、肝臓および脾臓) 中での全ケモカイン分子種の発現変動を検討したところ、大脳および小脳中では上述した 5 種に加えて、CCL3、CCL11、CCL1、CCL2 および CCL10 の発現レベルの上昇 (3 倍以上) が認められ、特に CCL3、CCL4 および CCL10 の発現レベルの上昇が顕著であった。これらのケモカインのうち、CCL3 および CCL4 以外のケモカインはメチル水銀投与によって腎臓中でも有意な発現上昇を示したが、CCL3 および CCL4 の発現誘導は脳以外の組織では認められなかった。この際の各組織中のメチル水銀濃度は腎臓>肝臓>脾臓>大脳>小脳の順であったことから、CCL3 および CCL4 はメチル水銀によって脳組織特異的に発現誘導されると考えられる。この知見は、メチル水銀によって脳特異的に発現誘導される蛋白質の存在が示唆された最初の例である。

メチル水銀による CCL3 および CCL4 の発現誘導は、マウス神経前駆細胞 (C17.2 細胞) 株でも認められたが、経時的に検討したところ CCL3 および CCL4

の mRNA レベルの上昇はメチル水銀による細胞死が引き起こされるより早い時点で認められた。また、メチル水銀を投与したマウスにおいても、脳組織での病理変化が認められる前に、両ケモカインの発現上昇が確認された。このことから、両ケモカインの発現誘導は、少なくともメチル水銀によって細胞が障害された結果として認められる現象ではなく、メチル水銀曝露に対する細胞応答によるものと考えられる。

最近、フランスの研究グループによって、ケモカインの一種である CCL2 がメチル水銀毒性に対して防御的に作用することがはじめて報告された。CCL3 および CCL4 とメチル水銀毒性との関係を検討したところ、両ケモカインのノックダウンによって細胞のメチル水銀感受性が高まったが、その程度はわずかであった。したがって、CCL3 および CCL4 もメチル水銀毒性に対して防御的な作用を有しているものの、その能力はあまり高くないと考えられる。

一方、C17.2 細胞を用いて CCL4 のプロモーター領域を reporter gene assay により解析したところ、転写開始点から上流 50 bp までの領域にメチル水銀による CCL4 の発現誘導に必要な領域が存在することが判明した。この領域中に認識配列が存在する 10 種の転写因子を 1 つずつ siRNA を用いてノックダウンすることによって、メチル水銀による CCL4 の発現誘導との関係を調べたところ、SRF (Serum Response Factor) または FOXA1 (Forkhead Box Protein A1) のノックダウンによってメチル水銀による CCL4 mRNA レベルの上昇が抑制されることが判明した。50 bp 中に含まれる FOXA1 の認識配列は SRF の認識配列中に完全に含まれることから、SRF の認識配列を含む DNA 断片を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、メチル水銀によってこの DNA 断片への結合量が増加する蛋白質の存在が認められた。また、メチル水銀投与後のマウス小脳においても、SRF/FOXA1 結合配列を含む DNA 断片への結合量が経時的に増加する蛋白

質の存在が確認された。この SRF/FOXA1 結合配列を含む DNA 断片をビオチン標識し、そこに結合する蛋白質をストレプトアビジンビーズを用いて回収して、ウェスタンブロッティングで検出したところ、CCL4 プロモーター上の配列への SRF および FOXA1 の結合量がメチル水銀によって増加することが示された。また、メチル水銀によって SRF および FOXA1 の核内レベルが増加したことから、メチル水銀は SRF および FOXA1 の核内濃度を上昇させることによって両転写因子の CCL4 プロモーター上への結合を促進させ、その結果として CCL4 の発現を誘導すると考えられる。SRF を介した転写反応は Rho シグナル経路および MAPK シグナル経路の 2 つの経路によって活性化されることが知られている。メチル水銀による SRF 依存的な遺伝子発現誘導機構における Rho シグナル経路および MAPK (JNK、p38 および ERK) シグナル経路の関与を検討したところ、本誘導機構には Rho シグナル経路および JNK の活性化は関与せず、p38 および ERK の活性化が関与していることが確認された。したがって、メチル水銀は p38 および ERK 依存的な SRF 転写機構の活性化を介して CCL4 の発現を誘導している可能性が考えられる。中枢神経系において MAPK 経路を介した SRF の活性化が神経細胞の分化や樹状突起形成、海馬形成などに関わる遺伝子の発現調節に関わるとの報告もある。マウスの各組織中での SRF 蛋白質濃度を調べたところ、SRF は腎臓や肝臓に比べて脳組織中に比較的高濃度に存在することが判明したことから、SRF が特に中枢神経系において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。一方、FOXA1 の中枢神経系における詳細な機能はほとんど明らかにされていない。今後、中枢神経系における SRF および FOXA1 の機能を詳細に検討することによってメチル水銀が示す脳選択的毒性の発現機構解明のための突破口が開かれるものと期待される。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科生体防御薬学分野教授 永沼 章 先生に深甚なる感謝の意を表します。

本論文をまとめるに際し、御校閲および有益なるご助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野教授 平澤 典保 先生、東北大学大学院薬学研究科薬理学分野准教授 山國 徹 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の病理組織免疫学的実験にあたり、有益なご助言、ご指導を賜った国立水俣病総合研究センター室長藤村 成剛 先生、東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野准教授 守屋 孝洋 先生に心より感謝申し上げます。

また、常日頃から有益なるご指導、ご助言を下さいました同大学院薬学研究科生体防御薬学分野講師 黄 基旭先生および実験ならびに論文作成の細部にわたり終始ご指導、ご協力をいただきました同分野助教 高橋 勉 先生に心より感謝申し上げます。

さらに、数々のご助言やご協力を賜りました愛知学院大学薬学部衛生薬学講座講師 李 辰竜 先生に心より感謝申し上げます。

また、様々な面でお世話になった生体防御薬学分野の皆様（岩井 美幸 博士、呉 成恩 氏、朱 俊軒 氏、佐藤 昌幸 氏、村上 聡一 氏、李 司陽 氏、松田 健人 氏）に深く感謝し、お礼申し上げます。

最後に、長くなった留学生生活をいつも信じて応援してくれた妻に心より感謝します。あなたと秀炫がいてくれたことが、学位を取得する大きな支えになりました。また、様々な面で支えていただいた両親や義理のご両親にも心より感謝致します。

引用文献

Alberti S., Krause S.M. Kretz O. Philippar U. Lemberger T. Casanova E. Wiebel F.F. Schwarz H. Frotscher M. Schütz G. and Nordheim A. (2004) Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 102(17), 6148-6153.

Allen S.J., Crown S.E. and Handel T.M. (2007) Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 787-820.

Aschner M. and Aschner J.L. (1990) Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood-brain barrier transport. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 14(2), 169-176.

Ballatori N. (2002) Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ. Health. Perspect.*, 110 Suppl 5, 689-694.

Barrett L.E., Sul J.Y. Takano H. Van Bockstaele E.J. Haydon P.G. and Eberwine J.H. (2006) Region-directed phototransfection reveals the functional significance of a dendritically synthesized transcription factor. *Nat. Methods.*, 3(6), 455-460.

Bless N.M., Huber-Lang M. Guo R.F. Warner R.L. Schmal H. Czermak B.J. Shanley T.P. Crouch L.D. Lentsch A.B. Sarma V. Mulligan M.S. Friedl H.P. and Ward P.A. (2000) Role of CC chemokines (macrophage inflammatory protein-1 beta, monocyte

chemoattractant protein-1, RANTES) in acute lung injury in rats. *J. Immunol.*, 164(5), 2650-2659.

Boven L.A., Montagne L. Nottet H.S. and De Groot C.J. (2000) Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions. *Clin. Exp. Immunol.*, 122(2), 257-263.

Carroll J.S., Liu X.S. Brodsky A.S. Li W. Meyer C.A. Szary A.J. Eeckhoutte J, Shao W, Hestermann E.V. Geistlinger T.R. Fox E.A. Silver P.A. and Brown M. (2005) Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell*, 122(1), 33-43.

Castoldi A.F., Johansson C. Onishchenko N. Coccini T. Roda E. Vahter M. Ceccatelli S. and Manzo L. (2008) Human developmental neurotoxicity of methylmercury: impact of variables and risk modifiers. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 51(2), 201-214.

Cowell R.M., Xu H. Galasso J.M. and Silverstein F.S. (2002) Hypoxic-ischemic injury induces macrophage inflammatory protein-1alpha expression in immature rat brain. *Stroke*, 33(3), 795-801.

Denizot F., Brunet J.F. Roustan P. Harper K. Suzan M. Luciani M.F. Mattei M.G. and Golstein P. (1989) Novel structures CTLA-2 alpha and CTLA-2 beta expressed in

mouse activated T cells and mast cells and homologous to cysteine proteinase proregions. *Eur. J. Immunol.*, 19(4), 631-635.

Eeckhoutte J., Carroll J.S. Geistlinger T.R. Torres-Arzayus M.I. and Brown M. (2006) A cell-type-specific transcriptional network required for estrogen regulation of cyclin D1 and cell cycle progression in breast cancer. *Genes. Dev.*, 20(18), 2513-2526.

Fahey T.J. 3rd., Tracey K.J. Tekamp-Olson P. Cousens L.S. Jones W.G. Shires G.T. Cerami A. and Sherry B. (1992) Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J. Immunol.*, 148(9), 2764-2769.

Ferri A.L., Lin W. Mavromatakis Y.E. Wang J.C. Sasaki H. Whitsett J.A. and Ang S.L. (2007) Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development*, 134(15), 2761-2769.

Giraud S.N., Caron C.M. Pham-Dinh D. Kitabgi P. and Nicot A.B. (2010) Estradiol inhibits ongoing autoimmune neuroinflammation and NFkappaB-dependent CCL2 expression in reactive astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(18), 8416-8421.

Godefroy D., Gosselin R.D. Yasutake A. Fujimura M. Combadière C. Maury-Brachet R. Laclau M. Rakwal R. Melik-Parsadaniantz S. Bourdineaud J.P. and Rostène W. (2012) The chemokine CCL2 protects against methylmercury neurotoxicity. *Toxicol. Sci.*, 125(1), 209-218.

Godiska R., Chantry D. Dietsch G.N. and Gray P.W. (1995) Chemokine expression in murine experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, 58(2), 167-176.

Grandjean P., Weihe P. Jørgensen P.J. Clarkson T. Cernichiari E. and Viderø T. (1992) Impact of maternal seafood diet on fetal exposure to mercury, selenium, and lead. *Arch. Environ. Health.*, 47(3), 185-195.

Grandjean P., Weihe P. White R.F. Debes F. Araki S. Yokoyama K. Murata K. Sørensen N. Dahl R. and Jørgensen P.J. (1997) Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19(6), 417-428.

Harada M. (1995) Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit. Rev. Toxicol.*, 25(1), 1-24.

Hwang G.W., Lee J.Y. Kim M.S. Sato M. Takahashi T. and Naganuma A. (2013) Changes in the levels of low molecular weight metabolites in the mouse cerebellum following treatment with methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, 38(5), 703-706.

Kim M.S., Takahashi T. Lee J.Y. Hwang G.W. and Naganuma A. (2012) Methylmercury induces CCL2 expression through activation of NF- κ B in human 1321N1 astrocytes. *J. Toxicol. Sci.*, 37(6), 1275-1278.

Knöll B. and Nordheim A. (2009) Functional versatility of transcription factors in the

nervous system: the SRF paradigm. *Trends. Neurosci.*, 32(8), 432-42.

Laganière J., Deblois G. Lefebvre C. Bataille A.R. Robert F. and Giguère V. (2005) From the Cover: Location analysis of estrogen receptor alpha target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(33), 11651-11656.

Lavaur J., Bernard F. Trifilieff P. Pascoli V. Kappes V. Pagès C. Vanhoutte P. and Caboche J. (2007) A TAT-DEF-Elk-1 peptide regulates the cytonuclear trafficking of Elk-1 and controls cytoskeleton dynamics. *J. Neurosci.*, 27(52), 14448-14458.

Lean J.M., Murphy C. Fuller K. and Chambers T.J. (2002) CCL9/MIP-1gamma and its receptor CCR1 are the major chemokine ligand/receptor species expressed by osteoclasts. *J. Cell. Biochem.*, 87(4), 386-393.

Lin T.H., Yao Z. Sato T. Keeney M. Li C. Pajarinen J. Yang F. Egashira K. and Goodman S.B. (2014) Suppression of wear-particle-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine production in macrophages via NF- κ B decoy oligodeoxynucleotide: A preliminary report. *Acta. Biomater.*, 10(8), 3747-55.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. chem.*, 87(4), 386-393.

Luster A.D. (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.*, 338(7), 436-445.

Maurer M. and von Stebut E. (2004) Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(10), 1882-1886.

Miano J.M. (2010) Role of serum response factor in the pathogenesis of disease. *Lab. Invest.*, 90(9), 1274-1284.

Miralles F., Posern G. Zaromytidou A.I. and Treisman R. (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*, 113(3), 329-342.

Mukherjee A.B., Zhang Z. and Chilton B.S. (2007) Uteroglobin: a steroid-inducible immunomodulatory protein that founded the Secretoglobin superfamily. *Endocr. Rev.*, 28(7), 707-725.

Noguchi Y., Shinozaki Y. Fujishita K. Shibata K. Imura Y. Morizawa Y. Gachet C. and Koizumi S. (2013) Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y(1) receptor-mediated pathways in astrocytes. *PLOS. One.*, 8(2), 578-598.

Nordgren T.M., Wyatt T.A. Sweeter J. Bailey K.L. Poole J.A. Heires A.J. Sisson J.H. and Romberger D.J. (2014) Motile cilia harbor serum response factor as a mechanism of environment sensing and injury response in the airway. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol.*

Physiol., 306(9), L829-839.

Posern G. and Treisman R. (2006) Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell. Biol.*, 16(11), 588-596.

Potter A.S., Casa A.J. and Lee A.V. (2012) Forkhead box A1 (FOXA1) is a key mediator of insulin-like growth factor I (IGF-I) activity. *J. Cell. Biochem.*, 113(1), 110-121.

Proffitt J., Crabtree G. Grove M. Daubersies P. Bailleul B. Wright E. and Plumb M. (1995) An ATF/CREB-binding site is essential for cell-specific and inducible transcription of the murine MIP-1 beta cytokine gene. *Gene.*, 152(2), 173-179.

Qiu M., Bao W. Wang J. Yang T. He X. Liao Y. and Wan X. (2014) FOXA1 promotes tumor cell proliferation through AR involving the Notch pathway in endometrial cancer. *BMC Cancer*, 11, 14:78.

Ren M., Guo Q. Guo L. Lenz M. Qian F. Koenen R.R. Xu H. Schilling A.B. Weber C. Ye R.D. Dinner A.R. and Tang W.J. (2010) Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *EMBO J.*, 29(23), 3952-3966.

Rollins B.J. (1997) Chemokines. *Blood*, 90(3), 909-928.

Sanfeliu C., Sebastià J. Cristòfol R. and Rodríguez-Farré E. (2003) Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox. Res.*, 5(4), 283-305.

Sarafi M.N., Garcia-Zepeda E.A. MacLean J.A. Charo I.F. and Luster A.D. (1997) Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *J. Exp. Med.*, 185(1), 99-109.

Selvaraj A. and Prywes R. (2004) Expression profiling of serum inducible genes identifies a subset of SRF target genes that are MKL dependent. *BMC Mol. Biol.*, 25, 5:13.

Shi M.M., Godleski J.J. and Paulauskis J.D. (1996) Regulation of macrophage inflammatory protein-1 α mRNA by oxidative stress. *J Biol Chem.* 271(10), 5878-5883.

Stott S.R., Metzakopian E. Lin W. Kaestner K.H. Hen R. and Ang S.L. (2013) Foxa1 and foxa2 are required for the maintenance of dopaminergic properties in ventral midbrain neurons at late embryonic stages. *J. Neurosci.*, 33(18), 8022-8034.

Speyer C.L., Gao H. Rancilio N.J. Neff T.A. Huffnagle G.B. Sarma J.V. and Ward P.A. (2004) Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Am. J. Pathol.*, 165(6), 2187-2196.

Szczuciński A. and Losy J. (2007) Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. *Acta. Neurol. Scand.*, 115(3), 137-146.

Takahashi T., Kim M.S. Saito T. Lee J.Y. Hwang G.W. and Naganuma A. (2013) Brain-specific induction of secretoglobin 3A1 expression in mice treated with methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, 38(6), 963-965.

Taylor A., Tang W. Bruscia E.M. Zhang P.X. Lin A. Gaines P. Wu D. and Halene S. (2014) SRF is required for neutrophil migration in response to inflammation. *Blood.*, 123(19), 3027-3036.

Thompson W.L. And Van Eldik L.J. (2009) Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes. *Brain Res.*, 1287, 47-57.

Vahter M., Akesson A. Lind B. Björs U. Schütz A. and Berglund M. (2000) Longitudinal study of methylmercury and inorganic mercury in blood and urine of pregnant and lactating women, as well as in umbilical cord blood. *Environ. Res.*, 84(2), 186-194.

Vanhoutte P., Nissen J.L. Brugg B. Gaspera B.D. Besson M.J. Hipskind R.A. and Caboche J. (2001) Opposing roles of Elk-1 and its brain-specific isoform, short Elk-1, in nerve growth factor-induced PC12 differentiation. *J. Biol. Chem.*, 276(7), 5189-5196.

Wells T.N., Power C.A. Shaw J.P. and Proudfoot A.E. (2006) Chemokine blockers--therapeutics in the making? Trends Pharmacol. Sci., 27(1), 41-47.

Wiesner P., Choi S.H. Almazan F. Benner C. Huang W. Diehl C.J. Gonen A. Butler S. Witztum J.L. Glass C.K. and Miller Y.I. (2010) Low doses of lipopolysaccharide and minimally oxidized low-density lipoprotein cooperatively activate macrophages via nuclear factor kappa B and activator protein-1: possible mechanism for acceleration of atherosclerosis by subclinical endotoxemia. Circ. Res., 107(1), 56-65.

Wolpe S.D., Davatelis G. Sherry B. Beutler B. Hesse D.G. Nguyen HT. Moldawer L.L. Nathan C.F. Lowry S.F. and Cerami A. (1988) Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. J. Exp. Med. 167(2), 570-581.

Xia M.Q., Qin S.X. Wu L.J. Mackay C.R. and Hyman B.T. (1998) Immunohistochemical Study of the β -Chemokine Receptors CCR3 and CCR5 and Their Ligands in Normal and Alzheimer's Disease Brains. Am. J. Pathol., 153(1), 31-37.

Yoshimura T., Robinson E.A. Tanaka S. Appella E. Kuratsu J. and Leonard E.J. (1989) Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. J. Exp. Med., 169(4), 1449-1459.

発表論文リスト

1. Kim M.S., Takahashi T. Lee J.Y. Hwang G.W. and Naganuma A. (2013) Global chemokine expression in methylmercury-treated mice: methylmercury induces brain-specific expression of CCL3 and CCL4. J. Toxicol. Sci., 38(6):925-929.
2. Takahashi T., Kim M.S. Saito T. Lee J.Y. Hwang G.W. and Naganuma A. (2013) Brain-specific induction of secretoglobin 3A1 expression in mice treated with methylmercury. J. Toxicol. Sci., 38(6):963-965.
3. Lee J.Y., Hwang G.W. Kim M.S. Takahashi T. and Naganuma A. (2012) Methylmercury induces a brain-specific increase in chemokine CCL4 expression in mice. J. Toxicol. Sci., 37(6), 1279-1282.